

化学物質と環境

令和元年度 化学物質分析法開発調査報告書

令和3年3月

環境省大臣官房
環境保健部環境安全課

本報告書は、化学物質環境実態調査において、地方公共団体等に委託した化学物質分析法開発調査の報告書等について、令和元年度化学物質環境実態調査分析法開発検討会議において検討した上で、とりまとめたものである。

なお、初期環境調査及び詳細環境調査の試料採取要領については、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 28 年 3 月）」を参照されたい。

（注）

1. 目次中の○印は、環境中の微量化学物質の分析法の開発がなされた媒体を示す。
2. 各分析法の冒頭、最後尾等に分析法開発担当者のコメント等が付されている場合があるので特に留意されたい。
3. 本報告書において用いられている分析関係語句のうち、商品名を示すものについては、適当な一般名が見当たらなかったためやむをえず使用しているものであり、環境省環境安全課においてその商品名の使用を推薦することを意味するものではない。
4. 本報告書に記載する分析法は、環境省環境安全課が関係地方公共団体等の協力を得て実施している化学物質環境実態調査に使用するため開発されたものであるため、個々の化学物質について当該分析法が最良ではない場合もあり得ることを了解されたい。

化学物質環境実態調査分析法開発検討会議（第一部会）

	今村 清	公立大学法人大阪府立大学 地域連携研究機構 21 世紀科学研究機構教育研究高度化支援センター研究員
	門上 希和夫	公立大学法人北九州市立大学 環境技術研究所 特命教授
	木村 久美子	環境省環境調査研修所 教官
座長	劔持 堅志	学校法人岡山理科大学 非常勤講師
	先山 孝則	大阪市立環境科学研究センター 研究主幹
	鈴木 茂	学校法人中部大学 客員教授
	中島 大介	国立研究開発法人国立環境研究所 室長
	橋本 俊次	国立研究開発法人国立環境研究所 室長
	松村 千里	兵庫県環境研究センター 研究主幹

化学物質環境実態調査分析法開発検討会議（第二部会）

	岩村 幸美	環境省環境調査研修所 教官
	四ノ宮 美保	公立大学法人埼玉県立大学 准教授
	白石 寛明	国立研究開発法人国立環境研究所 名誉研究員
	高澤 嘉一	国立研究開発法人国立環境研究所 主任研究員
	竹峰 秀祐	埼玉県環境科学国際センター 主任
	中野 武	国立大学法人大阪大学 環境安全研究管理センター 招へい教授
	長谷川 敦子	神奈川県環境科学センター 主任研究員
座長	福嶋 実	特定非営利活動法人環境測定品質管理センター 副理事長
	八木 正博	神戸市環境保健研究所 生活科学部 副部長

（敬称略、五十音順）

目 次

対象物質名	開発担当	対象媒体			分析法 記載頁
		水質	底質	大気	
アクリル酸イソノニル	日鉄テクノロジー	○			1
アクリル酸 <i>n</i> -オクチル	福岡県	○			39
アクリル酸イソオクチル		○			
アクリル酸 2-エチルヘキシル		○			
メタクリル酸 2-エチルヘキシル		○			
1-[2-(アリルオキシ)-2-(2,4-ジクロロフェニル)エチル]-1 <i>H</i> -イミダゾール	奈良県	○			74
2-(1,3-チアゾール-4-イル)-1 <i>H</i> -ベンゾイミダゾール		○			
4-(2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキサール-4-イル)-1 <i>H</i> -ピロール-3-カルボニトリル		○			
メチル=(<i>E</i>)-2-(2-{[6-(2-シアノフェノキシ)ピリミジン-4-イル]オキシ}フェニル)-3-メトキシアクリラート		○			
4,6-ジメチル- <i>N</i> -フェニルピリミジン-2-アミン		○			
[(3-アルカンアミド-プロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート (アルカンアミドの炭素数が 10、12、14、16 又は 18 で、直鎖型のもの) 又は(<i>Z</i>)-{[3-(オクタデカ-9-エンアミド)プロピル] (ジメチル) アンモニオ}アセタート	和歌山県				135
[(3-デカンアミドプロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート		○	○		
[(3-ドデカンアミドプロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート		○	○		
[(3-テトラデカンアミドプロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート		○	○		
[(3-ヘキサデカンアミドプロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート		○	○		
[(3-オクタデカンアミドプロピル) (ジメチル) アンモニオ]アセタート		○	○		
(<i>Z</i>)-{[3-(オクタデカ-9-エンアミド)プロピル] (ジメチル) アンモニオ}		○	○		

※ ≪ ≫括弧内の物質は、同時分析可能な物質であることを示す。

対象物質名	開発担当	対象媒体			分析法 記載頁
		水質	底質	大気	
アンピシリン	神戸市	○			211
クロフィブラート	名古屋市	○			240
クロフィブリン酸 《フェノフィブラート、クリノフィブラート、ベザフ ィブラート》		○			
ジブタン-1-イル=フタラート	川崎市	○			282
ジヘキサン-1-イル=フタラート		○			
フタル酸ジ- <i>n</i> -オクチル		○			
ビス(2-エチルヘキサン-1-イル)=フタラート		○			
ジイソオクチル=フタラート		○			
トリエチレンテトラミン	神奈川県	○			334
1,3,5-トリス(2,3-エポキシプロピル)-1,3,5-トリア ジン-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-トリオン	神奈川県			○	358
ビス(<i>N,N</i> -ジメチルジチオカルバミン酸) <i>N,N'</i> -エチ レンビス(チオカルバモイルチオ亜鉛)	名古屋市		○		378
ヘキサクロロエタン	山口県	○			404
ヘキサクロロシクロペンタジエン		○			
フタル酸ジノニル	神奈川県	○			434
ベンゼン-1,2-ジカルボン酸ジイソデシル		○			
ジウンデカン-1-イル=フタラート		○			
フタル酸ジメチル	横浜市	○			469
フタル酸ジエチル		○			
フタル酸ジイソブチル		○			
ベンゾフェノン-4	福岡県	○			504
ベンラファキシシ 《 <i>O</i> -デスメチルベンラファキシシ》	大阪府	○			530
メタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル	福岡県	○			581
りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル	福岡県	○			598

※ 《 》括弧内の物質は、同時分析可能な物質であることを示す。

アクリル酸イソノニル

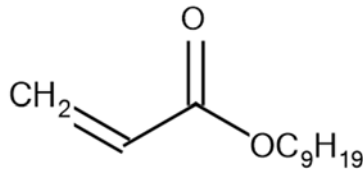
Isononyl acrylate

IUPAC 名：7-Methyloctyl prop-2-enoate

別名：イソノニル＝アクリラート

Acrylic acid isononyl ester

【対象物質の構造】



アクリル酸イソノニル (iNA) (分岐鎖異性体混合物)

CAS 番号：51952-49-9

分子式：C₁₂H₂₂O₂

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モノイットピック 質量)	比重 ¹⁾ (g/cm ³) (20 °C)	沸点 ²⁾ (°C)	融点 ²⁾ (°C)	蒸気圧 ²⁾ (mmHg) (20°C)	水溶解度 ²⁾ (mg/L) (25 °C)	log P _{ow} ²⁾ (計算値)
iNA	198.31 (198.162)	0.8840 ~ 0.8890	235.59	0.66	0.0584 (0.0777 hPa)	5.44	4.58

*：換算値（1 mmHg=1.33 hPa による。）

【毒性、用途】

【毒性】

[実験動物に対する急性毒性情報]³⁾

投与経路	(LD ₅₀ , mg/kg)	
	ラット	マウス
経口	2000	2800
腹腔内	400	410
皮下	-	660

〔用途〕⁴⁾

粘着剤・接着剤原料

出典：

- 1) 東京化成工業, <https://www.tcichemicals.com/JP/ja/structure-search>
- 2) Royal Society of Chemistry, ChemSpider, <http://www.chemspider.com/>
- 3) Danish (Q)SAR Database, <http://qsar.food.dtu.dk>
- 4) NITE Chemical Risk Information Platform (NITE 化学物質総合情報提供システム), https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

塩化ナトリウムを入れたバイアル瓶に水質試料を取り、内標準を添加してヘッドスペース-GC/MS-SIM 法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】(注 1)

アクリル酸イソノニル (iNA)	: 東京化成工業製 異性体混合物
ナフタレン- <i>d</i> ₈	: 富士フイルム和光純薬製 環境分析用
メタノール	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
塩化ナトリウム	: 富士フイルム和光純薬製 水質試験用
L(+)-アスコルビン酸	: 富士フイルム和光純薬製 特級
精製水	: エビアン、超純水（富士フイルム和光純薬製、LCMS 分析用）など

(以下、同時測定を検討した物質)

アクリル酸ヘキシル	: 東京化成工業製 96.0%以上
アクリル酸オクチル (<i>n</i> OA)	: 東京化成工業製 98.0%以上
アクリル酸イソオクチル (<i>i</i> OA)	: シグマアルドリッチ製 異性体混合物
アクリル酸 2-エチルヘキシル(2EHA)	: 東京化成工業製 99.0%以上
アクリル酸 <i>n</i> -ノニル(<i>n</i> NA)	: BOC Sciences 95%
アクリル酸 <i>n</i> -デシル(<i>n</i> DA)	: シグマアルドリッチ製 異性体混合物
アクリル酸イソデシル(<i>i</i> DA)	: 東京化成工業製 異性体混合物
アクリル酸ドデシル (<i>n</i> DoA)	: 東京化成工業製 98.0%以上
アクリル酸オクタデシル	: 東京化成工業製 97.0%以上

【標準液の調製】

〔標準液〕

各標準品 10.0 mg を正確に秤量し、メタノール 100 mL に溶解し、100 µg/mL の標準原液を調製する。

〔内標準液〕

ナフタレン-*d*₈ 10.0 mg を正確に秤量し、メタノール 100 mL に溶解し、100 µg/mL の内標準原液を調製する。内部標準原液（ナフタレン-*d*₈ 100 µg/mL）をメタノールで希釈し、10 µg/mL の内標準液を調製する。

〔検量線用標準液〕

標準原液をメタノールで希釈し、0.10、1.0 及び 10 µg/mL の検量線用標準液を調製する。

【器具】

試料採取容器（ふらん瓶等）：洗浄後、水ですすぎ、メタノールで洗浄後、約 105°C の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。

バイアル瓶（ヘッドスペース測定用(20 mL)）：洗浄後、水ですすぎ、メタノールで洗浄後、約 105°C の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。

シリコン/PTFE セプタム付きキャップ、メスフラスコ、ホールピペット、マイクロシリンジ（注 2）

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）における「試料の採取及び検体の調製等」に従う。試料は、0.1 g の L(+)-アスコルビン酸を添加した容量 100 mL 程度のガラス製容器（ふらん瓶等）に、気泡が入らないよう満水となるように採取する。なお、直ちに分析できない場合は、汚染のない冷暗所（10°C 以下）にて凍結しないように保存する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 10 mL を泡立てないよう、あらかじめ塩化ナトリウム 3.0 g（試料が海水の場合 2.7 g）を入れたヘッドスペース測定用バイアル瓶に分取する。直ちに、内標準液 2.0 µL を添加して密栓する。塩化ナトリウムが完全に溶解するまで混合したものを試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】に従って調製したものを空試験液とする。

【測定】

〔GC/MS 測定条件〕

〔GC/MS 条件〕（注 3）

使用機種	: SHIMADZU 製 2010 Plus
カラム	: Restek 製 Rtx-624 (60 m × 0.32 mm, 1.8 μm)
カラム温度	: 40 °C(1 min)→10 °C/min→230 °C (8 min)
注入方法	: 全量注入
キャリアーガス	: ヘリウム (34.9 cm/s)
キャリアーガス制御方式	: 定圧(80.4 kPa)
インターフェース温度	: 230 °C
イオン源温度	: 220 °C
イオン化電流	: 60 μA
イオン化電圧	: 70 V
測定モード	: SIM

〔ヘッドスペース条件〕（注 3）

使用機種	: Perkin Elmer 製 Turbomatrix-40
オーブン温度	: 70 °C
サンプルライン温度	: 100 °C
トランスファーライン温度	: 200 °C
バイアル加圧用ガス圧力	: 180 kPa
バイアル保温時間	: 30 分
バイアル加圧時間	: 3 分
注入時間	: 0.15 分
試料導入方式	: 圧力バランス方式

物質名	モニターイオン (m/z)	
	定量	確認 (注 4)
アクリル酸イソノニル	55	69、70、84、97
ナフタレン- <i>d</i> ₈	136	-

〔検量線〕

精製水 10 mL を泡立てないよう、あらかじめ塩化ナトリウム 3.0 g を入れたヘッドスペース測定用バイアル瓶に分取する。直ちに、0.10、1.0 及び 10 μg/mL の検量線用混合標準液 1.0～20 μL (0.050～10 ng/mL の検量線範囲となるように) 及び 10 μg/mL の内標準液 2.0 μL を添加し、密栓する。塩化ナトリウムが完全に溶解するまで混合した後、ヘッドスペース-GC/MS で分析する。対象物質 (注 5)

と内標準の濃度比及び得られたピーク面積比を用いて検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 10 mL をヘッドスペース-GC/MS を用いて測定し、得られた対象物質（注 5）と内標準物質のピーク面積比から検量線を用いて対象物質濃度を求める。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C ($\mu\text{g/L}$) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めた内標準物質濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料中に添加した内標準の量 (μg)

(= 添加する内標準の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) $\times$ 添加する内標準の容量 (μL)) / 1000

V : 試料水量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 0.020 \text{ (}\mu\text{g)}$$

(= 添加内標準の濃度 (10 $\mu\text{g/mL}$) $\times$ 添加内標準の容量 (2.0 μL)) / 1000

$$V = 0.010 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 2.0 \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

である。

〔装置検出下限 (IDL) 〕

本分析に用いたヘッドスペース-GC/MS の IDL を表 1 に示す（注 5、注 6）。

表 1 IDL の算出結果

物質名	試料量 (L)	IDL (ng/mL)
アクリル酸イソノニル	0.010	0.0047*

*: アクリル酸イソノニル異性体合算値（ピーク No. 3、6～10 の合算）

〔分析方法の検出下限 (MDL)及び定量下限 (MQL)〕

本分析の MDL 及び MQL を表 2 に示す（注 7）。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料	試料量 (L)	MDL* (µg/L)	MQL* (µg/L)
アクリル酸イソノニル	河川水	0.010	0.0082	0.021

* : アクリル酸イソノニル異性体合算値 (ピーク No. 3、6～10 の合算)

注 解

- (注1) 使用する試薬類は、あらかじめブランクが無いことを確認しておく。
本検討には、メタノール（富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用）、塩化ナトリウム（富士フイルム和光純薬製 水質試験用）、L(+)-アスコルビン酸（富士フイルム和光純薬製 特級）を使用した。また、精製水にはエビアン、超純水（富士フイルム和光純薬製、LCMS 分析用）が使用可能であった。なお、精製水に起因するブランクを差し引くことはできない。
- (注2) マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。また、ガラス器具は JIS R 3505 に記載のクラス A のものを使用する。
- (注3) ヘッドスペース-GC/MS の条件は、本測定に使用した機種（Perkin Elmer 製 Turbomatrix-40 及び SHIMADZU 製 2010 Plus）特有のものである。機種によって最適条件が異なる。
- (注4) 本測定に使用した機種における確認イオンを表 3 に示す。ただし、機種によって検出パターンが異なることもあるので、機種に応じた確認イオンを設定する（図 5 参照）。

表 3 アクリル酸イソノニルの確認イオン一覧

	アクリル酸イソノニルピーク番号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
確認イオン (m/z)	70	70	70	70	70	69	84	70	69	70	70

- (注5) 市販されているアクリル酸イソノニルの標準物質は異性体混合物で、本測定条件ではピークが 11 本検出される。そのうち、主要ピークであるピーク 6 本（ピーク No. 3、6～10）を測定の対象物質とした（ピーク 6 本合計の SCAN 面積百分率は約 89%。ピーク No. 1、2、4 及び 5 は面積百分率がそれぞれ約 2% であり、ピーク No. 11 は面積百分率が約 4% に加え、アクリル酸ノニルとピークが重なるため除外）。クロマトグラムは図 5 参照。
対象物質のピーク面積は、ピーク No. 3、6～10 の面積の合計値とする。

(注6) IDL は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って算出した。算出結果を表 4 に、測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表 4 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	アクリル酸イソノニル
試料量 (mL)	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.050
結果 1 (ng/mL) *2	0.0521
結果 2 (ng/mL) *2	0.0539
結果 3 (ng/mL) *2	0.0530
結果 4 (ng/mL) *2	0.0525
結果 5 (ng/mL) *2	0.0512
結果 6 (ng/mL) *2	0.0520
結果 7 (ng/mL) *2	0.0502
平均値 (ng/mL) *2	0.05213
標準偏差 (σ_{n-1}) (ng/mL) *2	0.00122
IDL (ng/mL) *1, 2	0.0047
S/N	3~7
CV (%)	2.3

*1: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*2: アクリル酸イソノニル異性体合算値 (ピーク No.3、6~10 の合算)

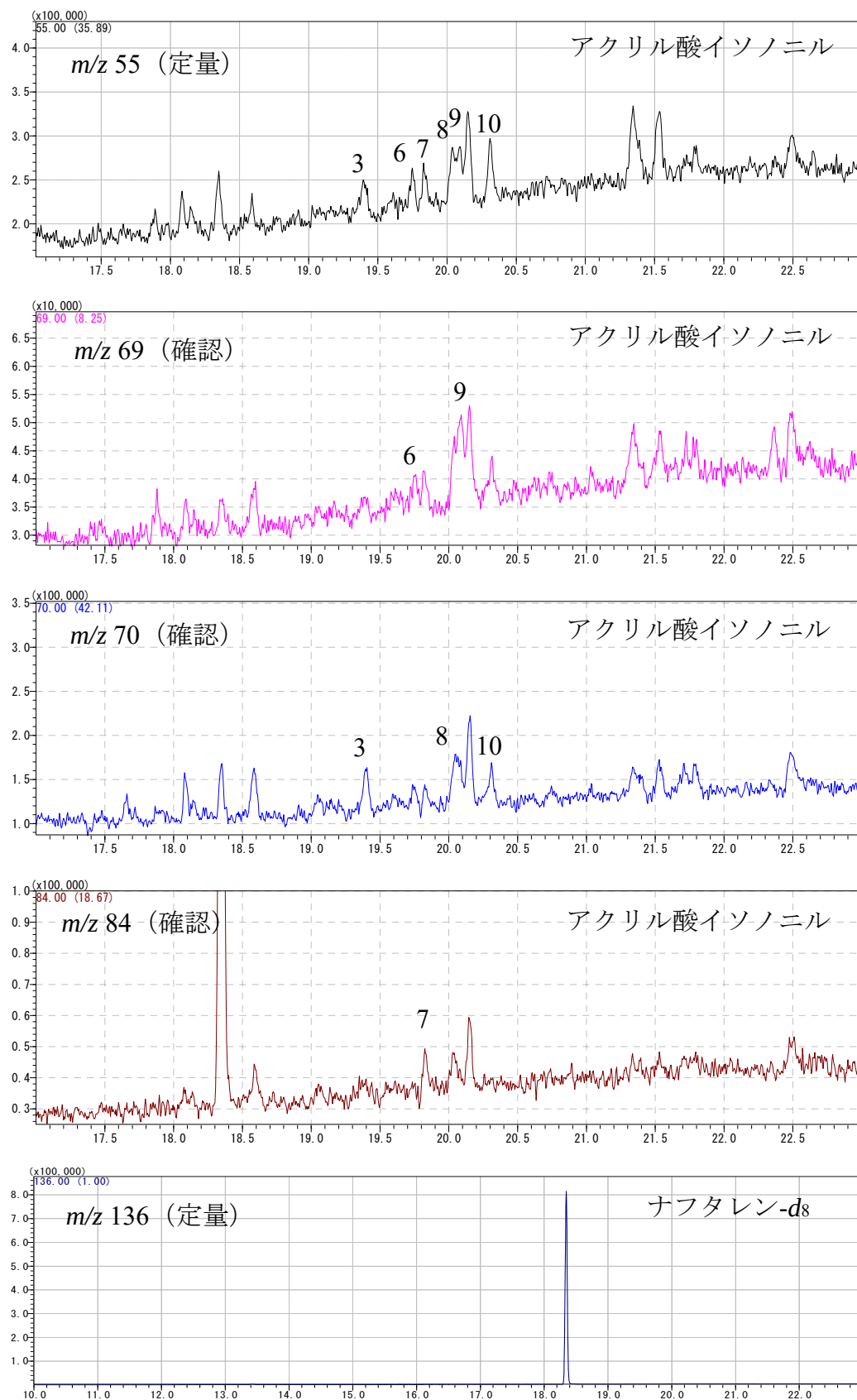


図 1 IDL 測定時のクロマトグラム

(注7) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 5 のとおり算出した。また、図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 5 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

物質名	アクリル酸イソノニル	回収率(%)
試料	河川水	-
試料量 (L)	0.010	-
標準添加量 (μg)	0.00050	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.050	-
操作ブランク平均 (μg/L) ^{*1, 5}	< 0.0082	-
無添加平均 (μg/L) ^{*2, 5}	< 0.0082	-
結果 1 (μg/L) ^{*5}	0.0426	85
結果 2 (μg/L) ^{*5}	0.0437	87
結果 3 (μg/L) ^{*5}	0.0410	82
結果 4 (μg/L) ^{*5}	0.0464	93
結果 5 (μg/L) ^{*5}	0.0457	91
結果 6 (μg/L) ^{*5}	0.0447	89
結果 7 (μg/L) ^{*5}	0.0467	93
平均値 (μg/L)	0.04438	88.8
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00211	-
MDL (μg/L) ^{*3, 5}	0.0082	-
MQL (μg/L) ^{*4, 5}	0.021	-
S/N	3~7	-
CV(%)	4.7	-

*1:空試験液を測定した値の平均値 (n = 3)

*2:MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 3)

*3:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

*5:アクリル酸イソノニル異性体合算 (ピーク No.3、6~10 の合算)

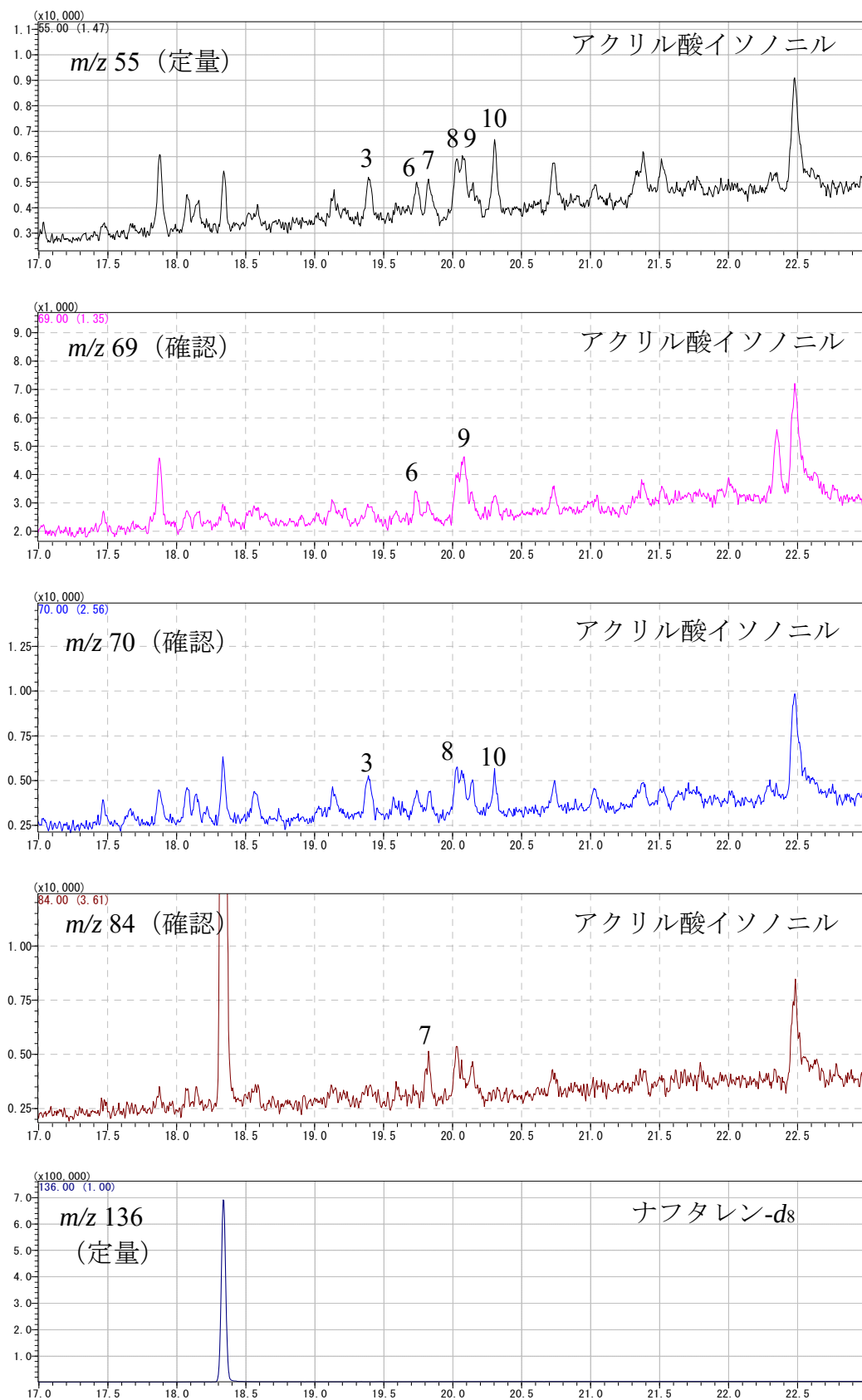


図2 MDL 測定時のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図 3 に示す。

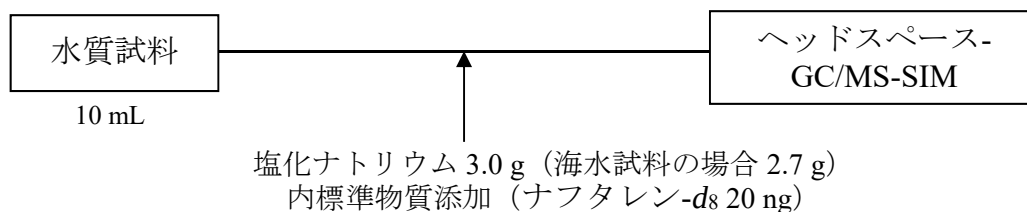


図 3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図 4 に、検量線データを表 6 に示す。

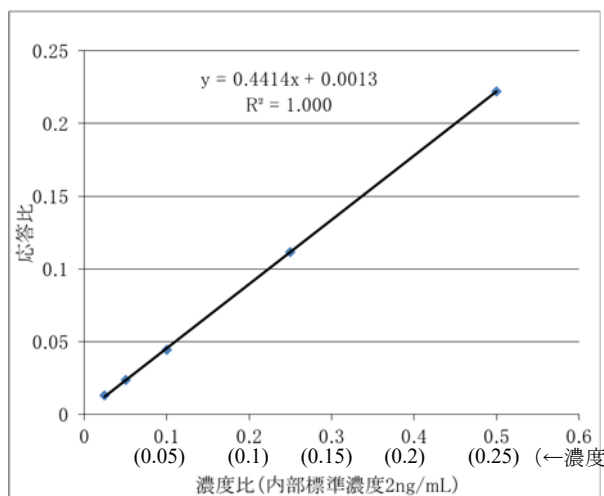


図 4-1 アクリル酸イソノニルの
検量線
(濃度範囲 : 0.050 ~ 1.0 ng/mL)
ピーク No.3、6~10 の合算

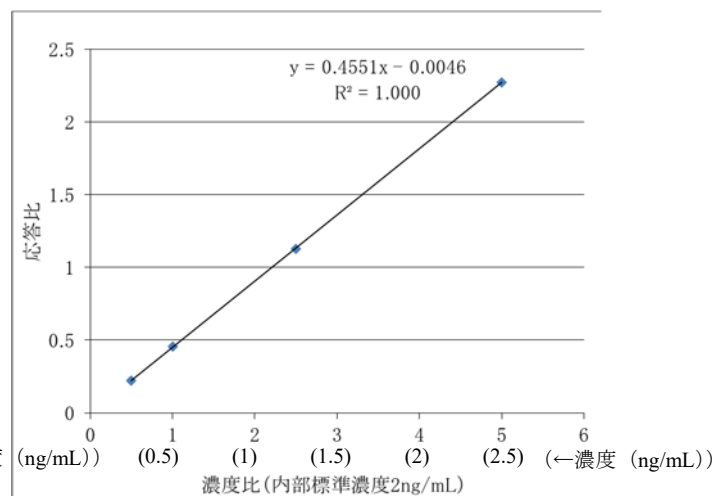


図 4-2 アクリル酸イソノニルの
検量線
(濃度範囲 : 1.0 ~ 10 ng/mL)
ピーク No.3、6~10 の合算

表 6 アクリル酸イソノニルの検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is})	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s) アクリル酸イソノニル (m/z 55)	内標準(A _{is}) ナフタレン-d ₈ (m/z 136)	
0.050	0.025	22834	1755203	0.0130
0.10	0.050	34040	1446970	0.0235
0.20	0.10	92487	2073185	0.0446
0.50	0.25	230242	2064294	0.1115
1.0	0.5	447083	2011802	0.2222
2.0	1.0	868700	1913225	0.4541
5.0	2.5	1362734	1207722	1.1284
10	5.0	4414523	1942746	2.2723

内標準濃度：2.0 ng/mL

〔クロマトグラム〕

アクリル酸イソノニル及びナフタレン-d₈ の標準液のクロマトグラムをそれぞれ図 5～8 に示す。

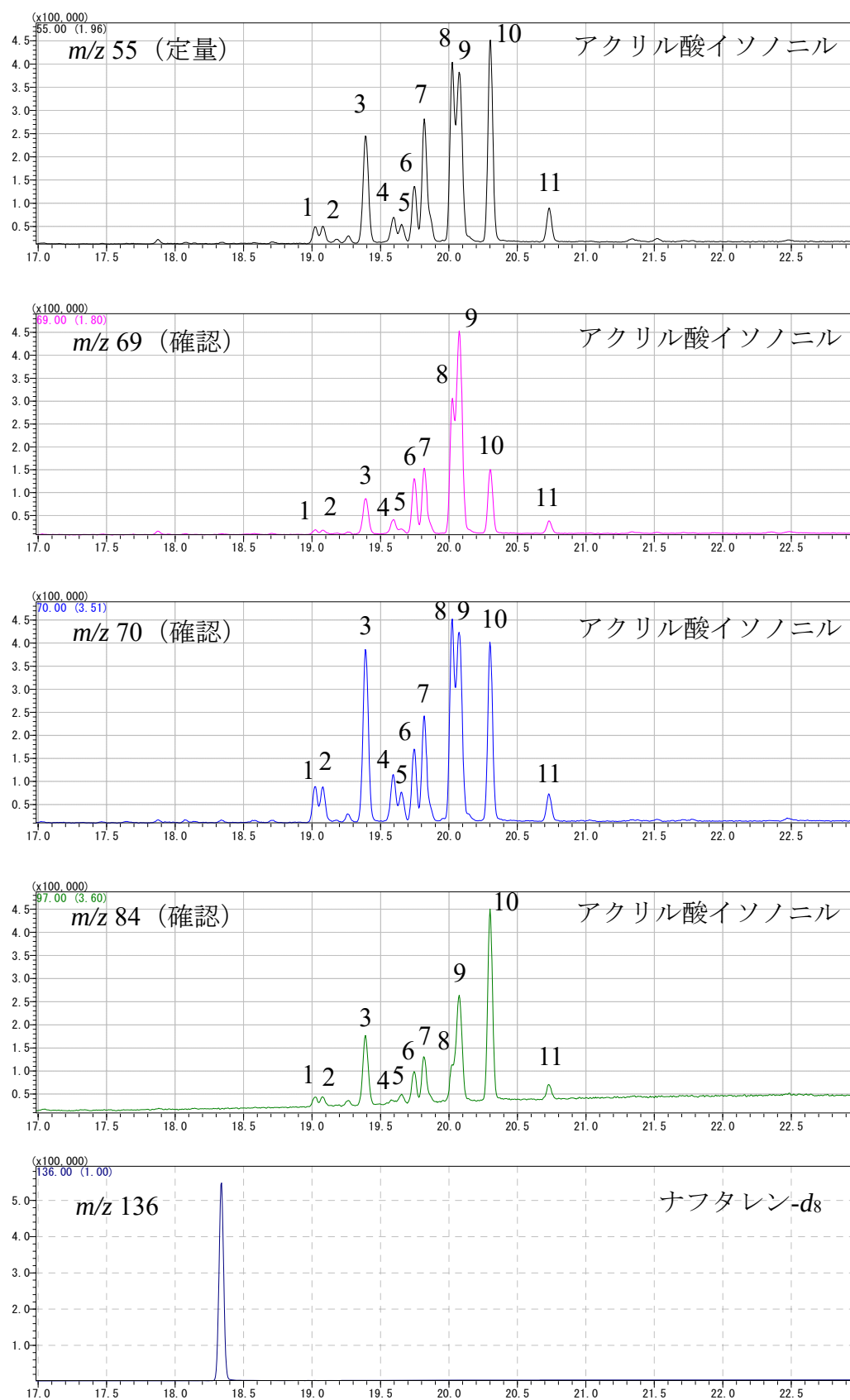


図5 標準液のSIMクロマトグラム(0.50 ng/mL)

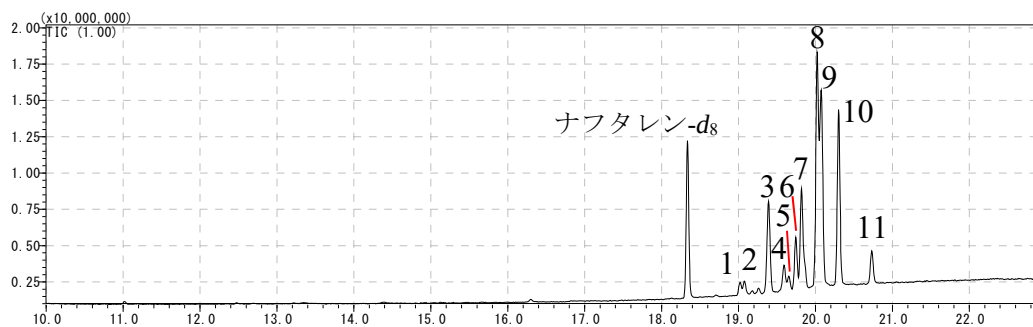


図 6 アクリル酸イソノニルのクロマトグラム(SCAN) 100 ng/mL
(ナフタレン- d_8 20 ng/mL)

表 7 アクリル酸イソノニルの各異性体ピークの面積値(100 ng/mL)及び割合

ピーク番号	面積	割合(%)
1	416126	2
2	421792	2
3	3117406	11
4	668409	2
5	421517	2
6	1396917	5
7	3685844	14
8	5089507	19
9	5304082	1
10	5743921	21
11	1024918	4
計	27290439	100

* ピーク No.3、6～10 を合計すると割合は 89 %

アクリル酸イソノニルと保持時間が近接するアクリル酸オクチル及びアクリル酸ノニルのクロマトグラムについて図 7 及び図 8 に示す。

アクリル酸オクチル及びアクリル酸ノニルはアクリル酸イソノニル異性体の主要ピーク No.3、6～10 に重ならない保持時間であることを確認した。

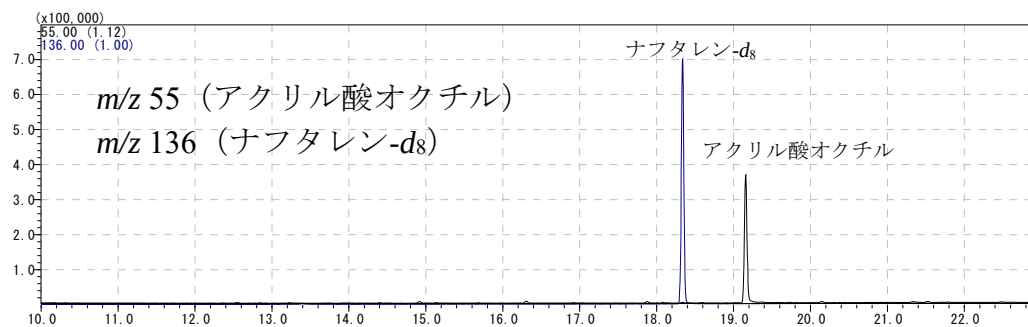


図 7 ナフタレン- d_8 とアクリル酸オクチルのクロマトグラム(SIM)各 2.0 ng/mL

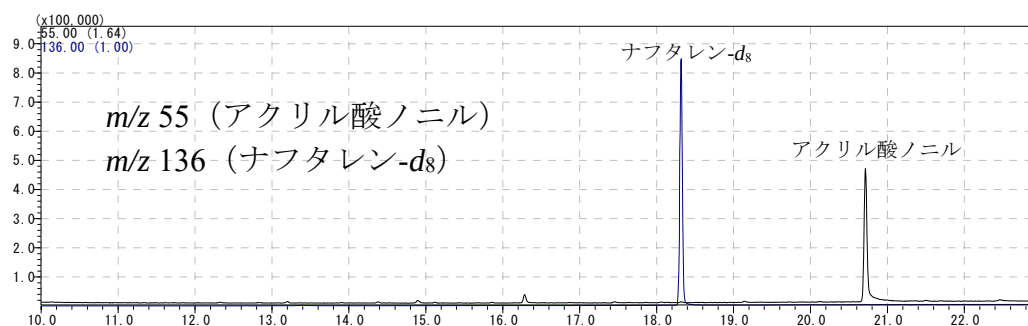


図 8 ナフタレン- d_8 とアクリル酸ノニルのクロマトグラム(SIM)各 2.0 ng/mL

〔マススペクトル〕

各標準物質のマススペクトルを図 9～20 に示す。

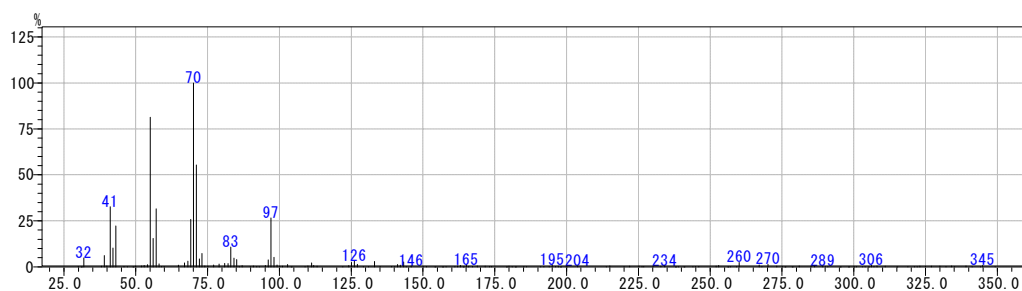


図 9 アクリル酸イソノニル (ピーク No.1) のマススペクトル

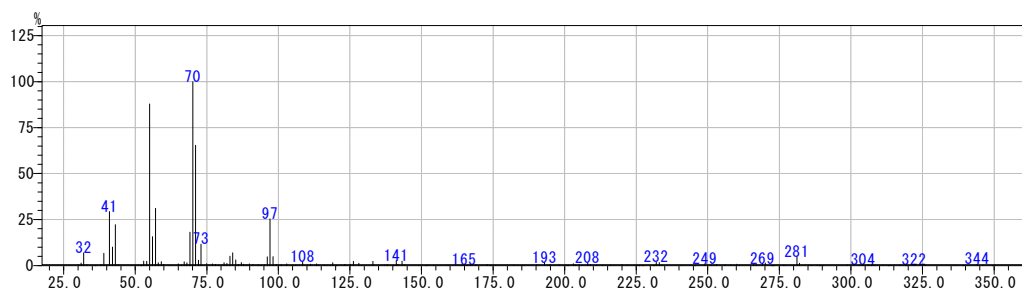


図 10 アクリル酸イソノニル (ピーク No.2) のマススペクトル

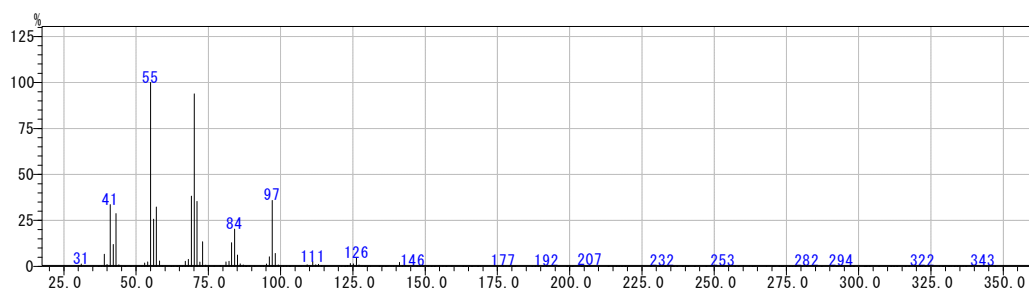


図 11 アクリル酸イソノニル（ピーク No.3）のマススペクトル

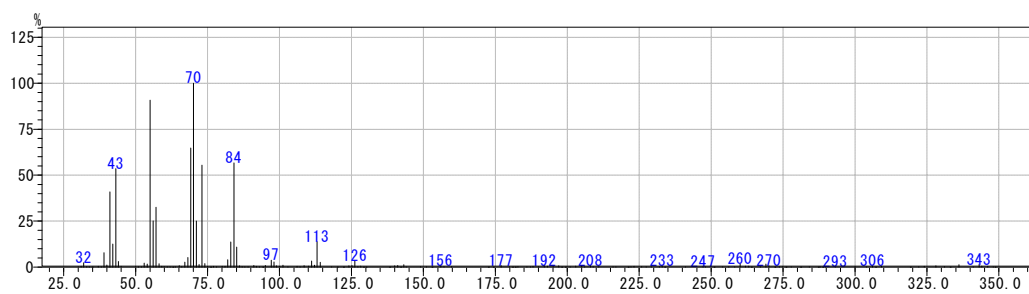


図 12 アクリル酸イソノニル（ピーク No.4）のマススペクトル

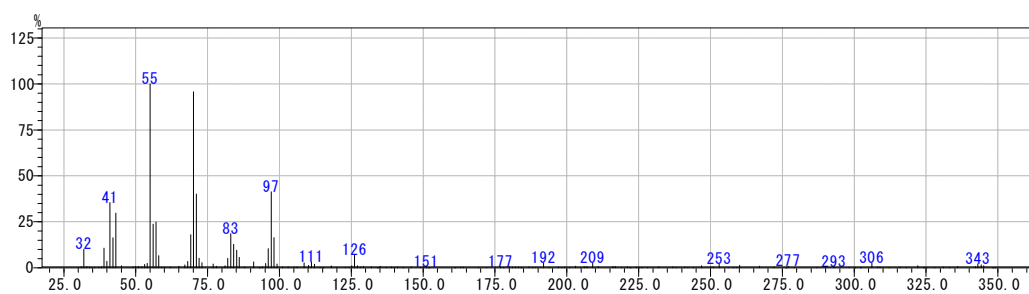


図 13 アクリル酸イソノニル（ピーク No.5）のマススペクトル

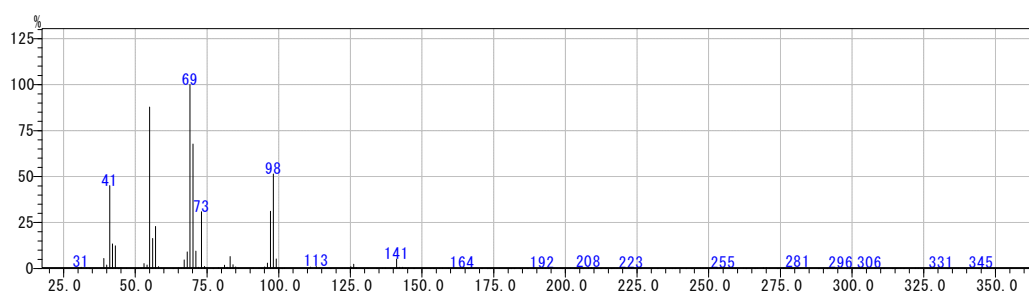


図 14 アクリル酸イソノニル（ピーク No.6）のマススペクトル

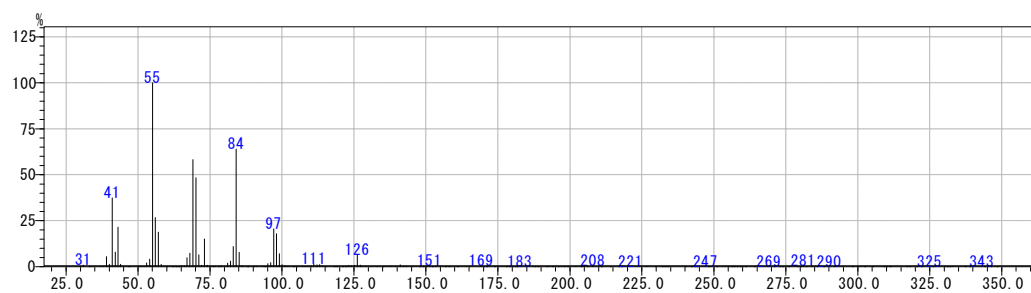


図 15 アクリル酸イソノニル (ピーク No.7) のマススペクトル

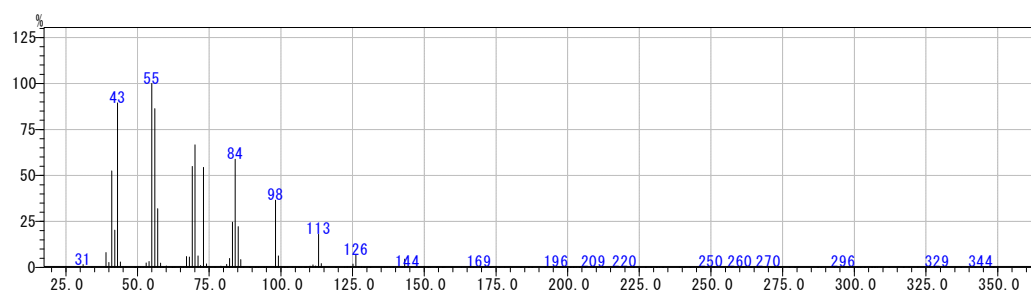


図 16 アクリル酸イソノニル (ピーク No.8) のマススペクトル

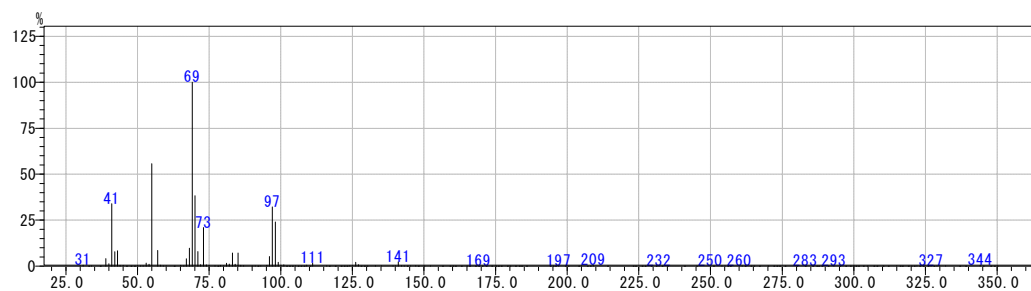


図 17 アクリル酸イソノニル (ピーク No.9) のマススペクトル

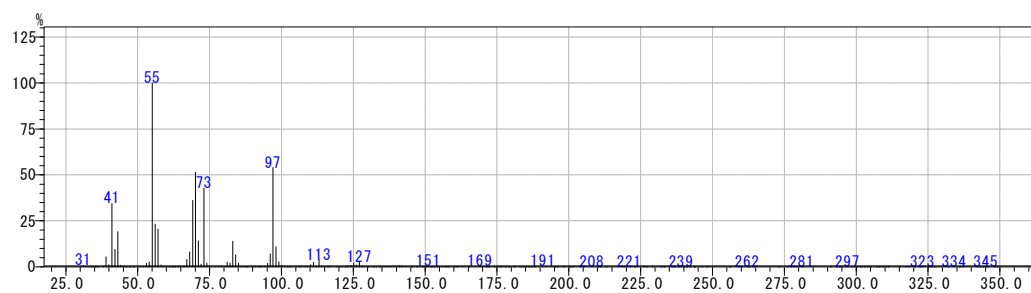


図 18 アクリル酸イソノニル (ピーク No.10) のマススペクトル

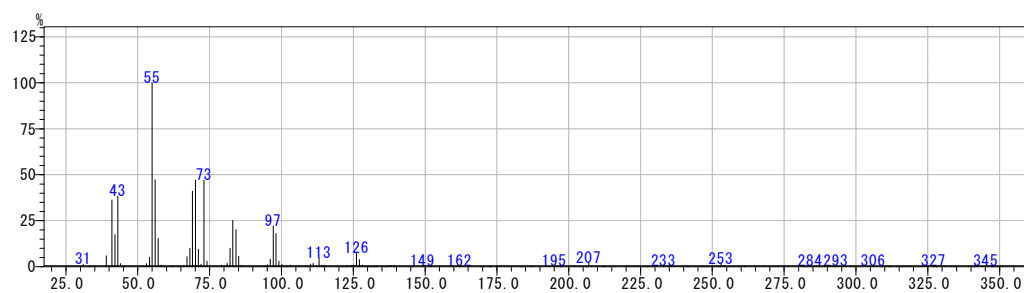


図 19 アクリル酸イソノニル (ピーク No.11) のマススペクトル

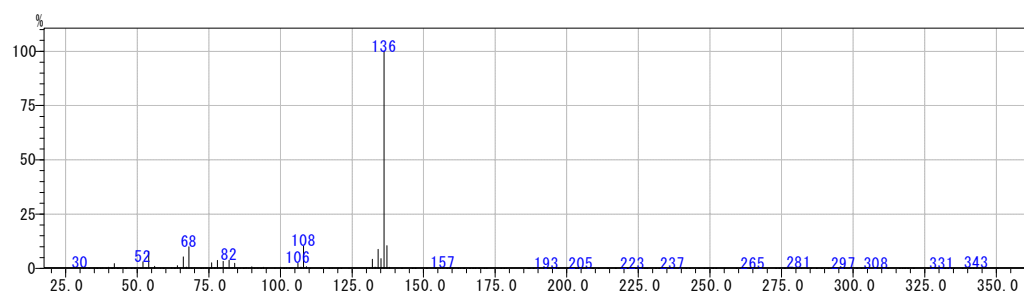


図 20 ナフタレン- d_8 のマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクの試験結果を表 8 に、クロマトグラムを図 21 に示す。

表 8 操作ブランク試験結果

物質名	試験数	検出濃度* ($\mu\text{g/L}$)
アクリル酸イソノニル	2	< 0.0082

*:アクリル酸イソノニル異性体合算値（ピーク No.3、6～10 の合算）

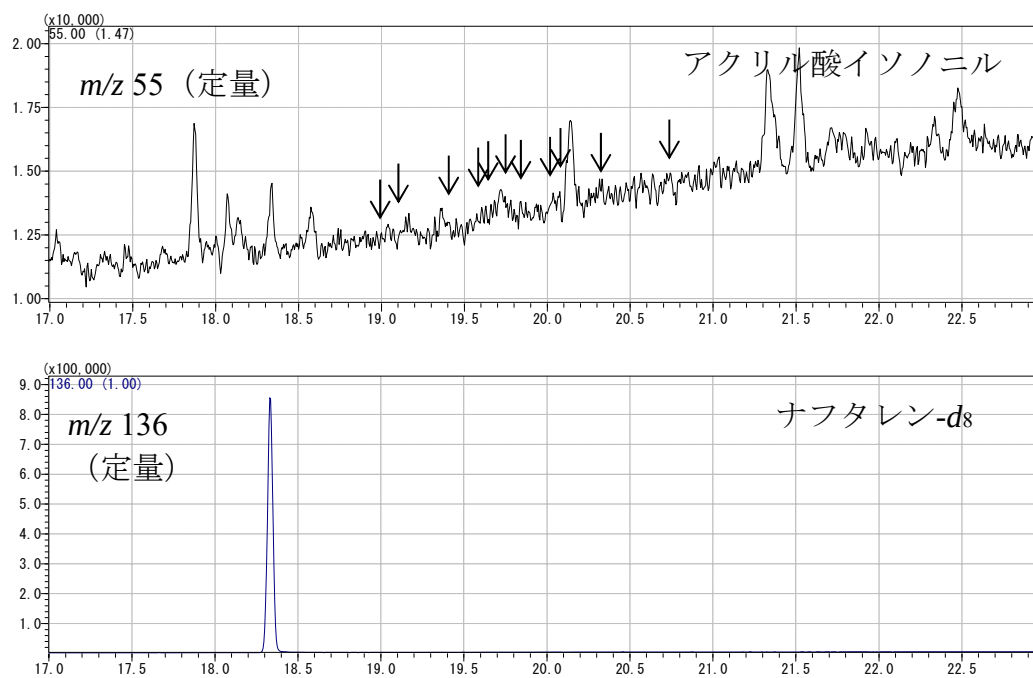


図 21 操作ブランク試験のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水、海水への添加回収試験結果を表 9 に、クロマトグラムを図 22 及び図 23 に示す。

表 9 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	試験 数	添加量 (μg)	検出 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
アクリル酸	河川水	0.010	2	0	< 0.0082	-	-
		0.010	5	0.010	0.905	90.5	3.9
イソノニル	海水	0.010	2	0	< 0.0082	-	-
		0.010	5	0.010	1.05	105	1.1

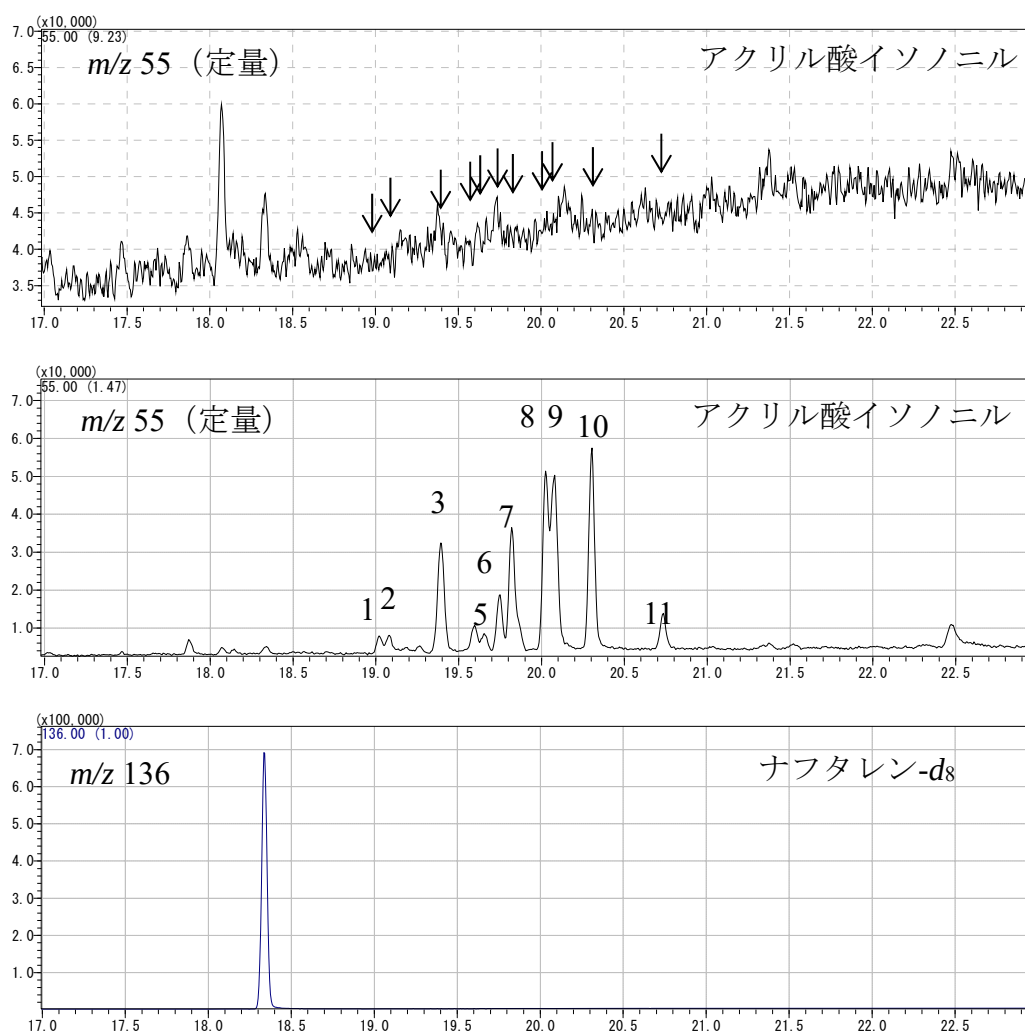


図 22 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム
（上図；無添加試料、中図；添加試料 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、下図：内標準物質）

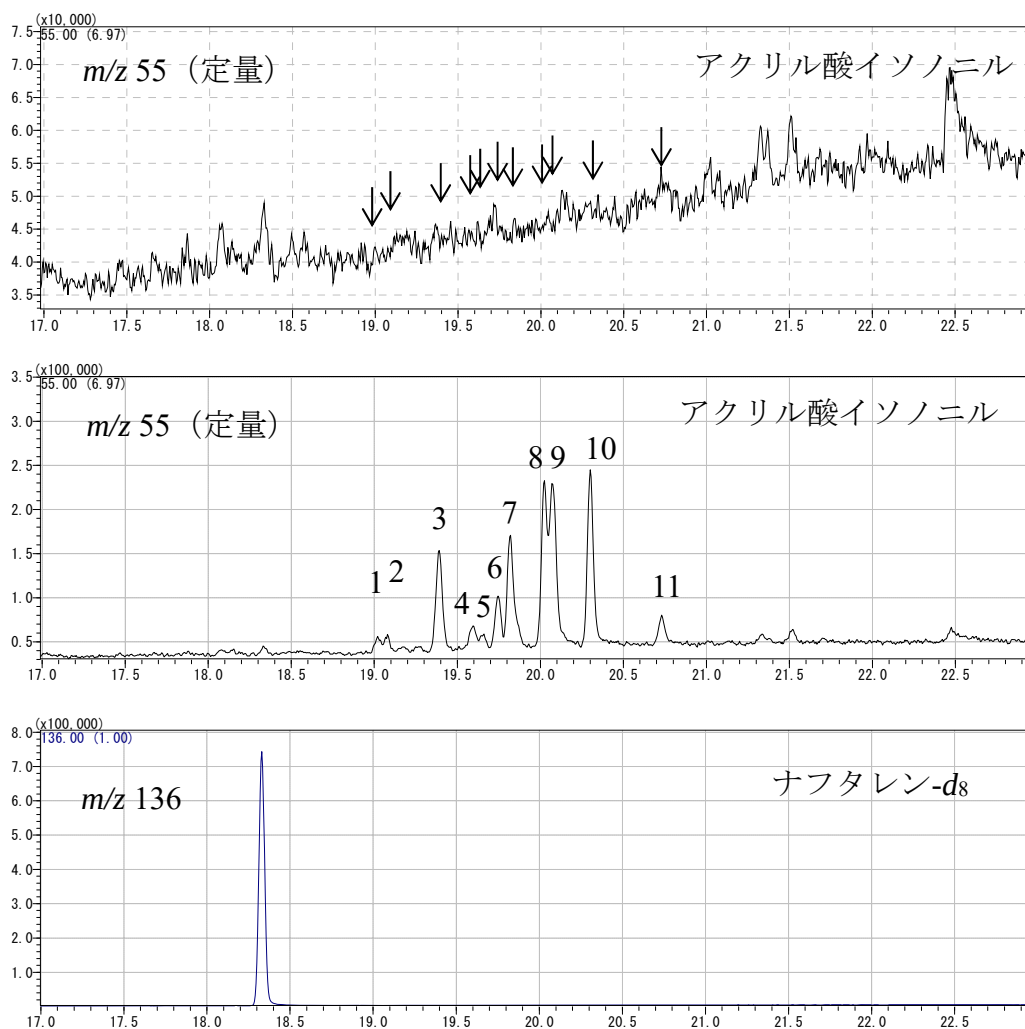


図 23 添加回収試験（海水）のクロマトグラム
（上図；無添加試料、中図；添加試料 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、下図：内標準物質）

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 10 に示す。

調製後 1 時間では、pH 5、pH 7、pH 9 とも安定であったが、7 日間後は、暗所でいづれも 10 % 以下、明所 pH 7 で 33 % の残存率で低下が見られた。

表 10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	検出濃度($\mu\text{g/L}$) (残存率(%)) *		
				1 時間後	7 日間後	
					暗所	明所
アクリル酸 イソノニル	5	2	100	96.4(96)	5.16(5)	-
	7	2	100	94.2(94)	8.63(9)	33.08(33)
	9	2	100	105.6(106)	5.17(5)	-

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

河川水におけるアクリル酸イソノニルの保存性について、表 11 に示す。なお、アスコルビン酸を添加しない試料は残存率の低下が見られたが、添加した試料において残存率は良好な結果であった。

表 11 アクリル酸イソノニルの保存性試験結果

試料	アスコル ビン酸 添加	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	検出濃度($\mu\text{g/L}$) (残存率(%)) *						
			保存期間 (日)						
			当日	1	3	5	7	14	1 ヶ月
河川水	無	0.10	-	0.043 (43)	-	-	0.008 (8)	0 (0)	-
	有	0.10	0.102 (102)	0.100 (100)	-	0.105 (105)	0.092 (92)	0.089 (89)	-
	無	1.0	-	0.46 (46)	-	-	0.15 (15)	0 (0)	-
	有	1.0	1.00 (100)	1.00 (100)	1.06 (106)	1.04 (104)	0.81 (81)	0.76 (76)	-
海水	無	0.10	-	0.060 (60)	-	-	0.032 (32)	0 (0)	-
	有	0.10	-	0.097 (97)	-	0.096 (96)	0.090 (90)	0.079 (79)	-
	無	1.0	-	0.55 (55)	-	-	0.13 (13)	0.06 (6)	-
	有	1.0	-	1.01 (101)	1.00 (100)	1.01 (101)	0.93 (93)	0.79 (79)	-
標準液	中間濃度	1 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	1.01 (101)
	高濃度	10 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	9.89 (99)

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔環境試料の分析〕

本分析法を用いて北九州市内の河川水（奥畑川）及び海水（恒見沖）を測定した結果、アクリル酸イソノニルはどちらも MDL 未満であった。

【参考資料】

本分析法により、アクリル酸イソノニルと同時測定が可能なアクリル酸エステルの検討を行った。

同時測定を検討した物質は、アクリル酸ヘキシル、アクリル酸オクチル (nOA)、アクリル酸イソオクチル (iOA)、アクリル酸 2-エチルヘキシル(2EHA)、アクリル酸 n-ノニル(nNA)、アクリル酸 n-デシル(nDA)、アクリル酸イソデシル(iDA)、アクリル酸ドデシル (nDoA)、アクリル酸オクタデシルの 9 成分である。

各アクリル酸エステルの分析結果クロマトグラム(SCAN)及び MS スペクトルを図 24～図 36 に示し、アクリル酸イソノニルと混合した液を分析したクロマトグラムを図 37～52 に示す。

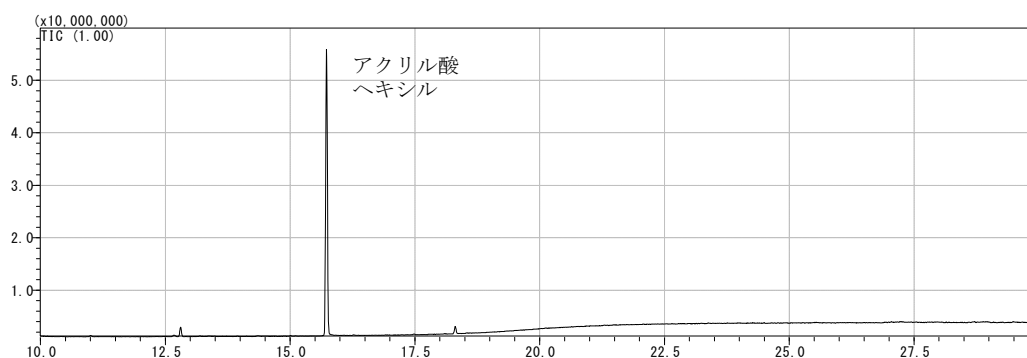


図 24 アクリル酸ヘキシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

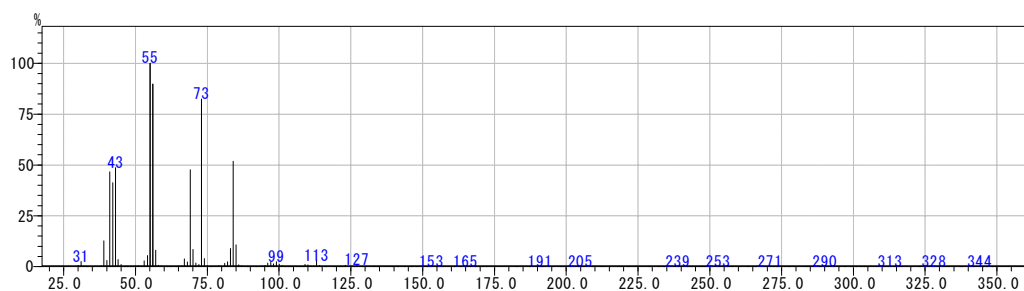


図 25 アクリル酸ヘキシルの MS スペクトル

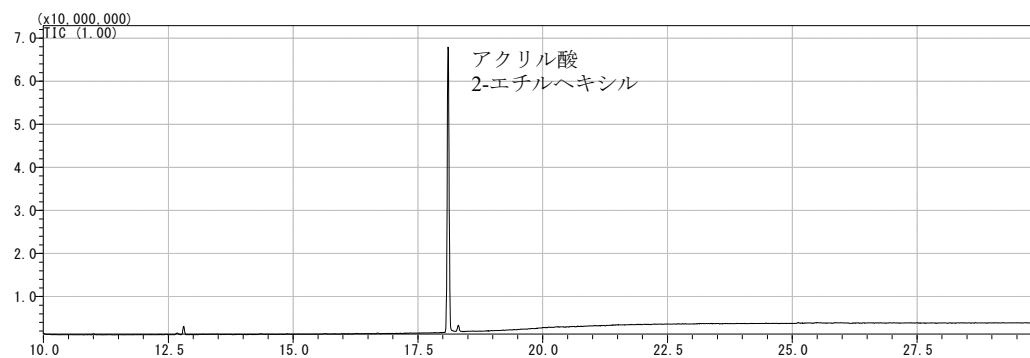


図 26 アクリル酸 2-エチルヘキシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

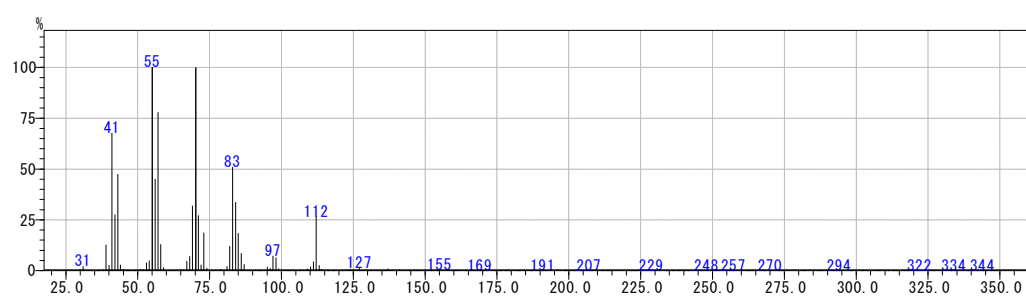


図 27 アクリル酸 2-エチルヘキシルの MS スペクトル

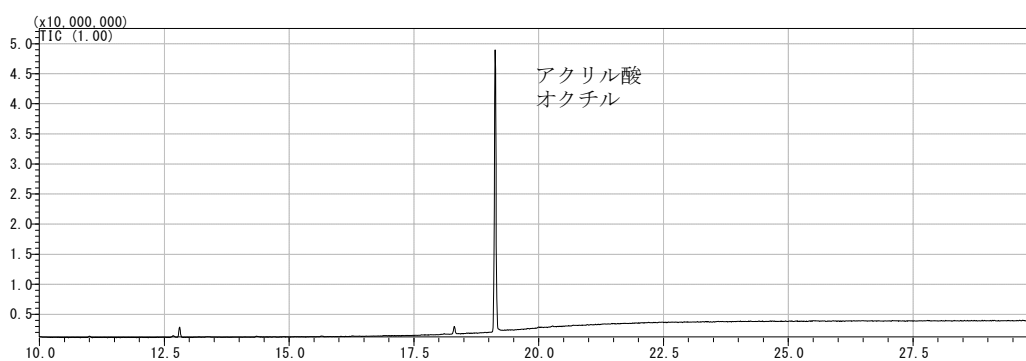


図 28 アクリル酸オクチルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

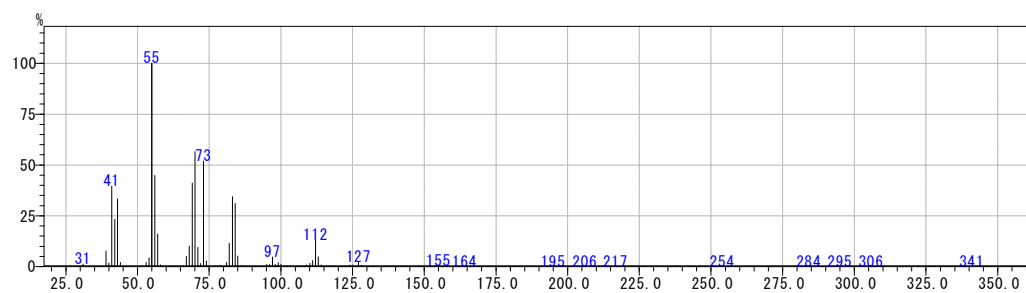


図 29 アクリル酸オクチルの MS スペクトル

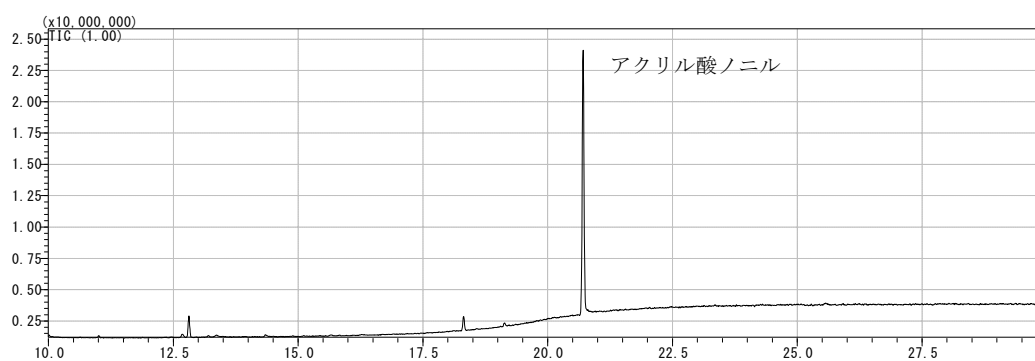


図 30 アクリル酸ノニルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

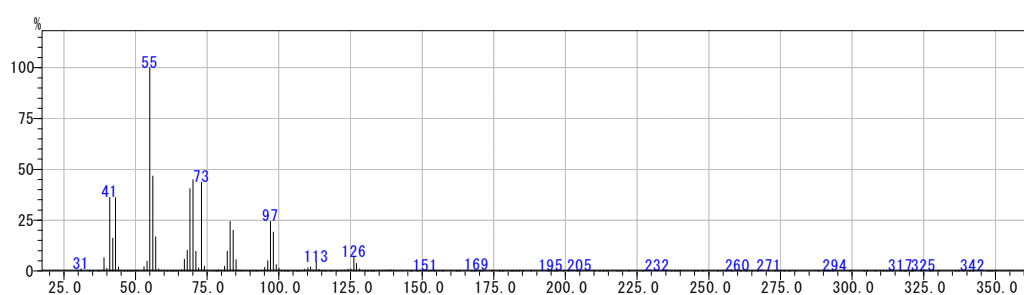


図 31 アクリル酸ノニルの MS スペクトル

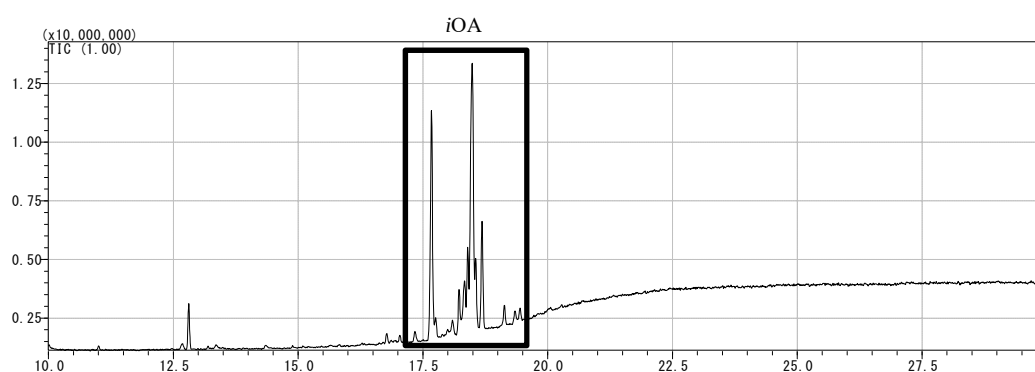


図 32 アクリル酸イソオクチルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

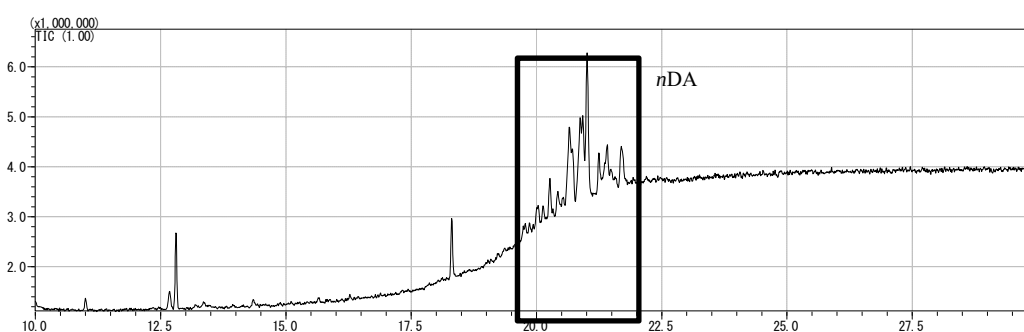


図 33 アクリル酸デシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

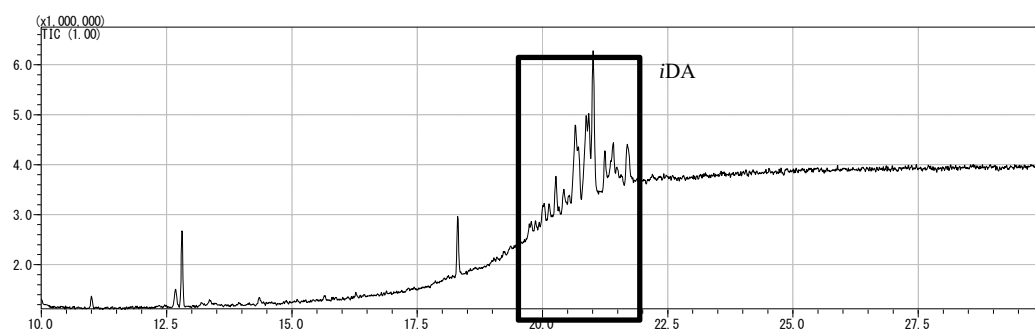


図 34 アクリル酸イソデシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

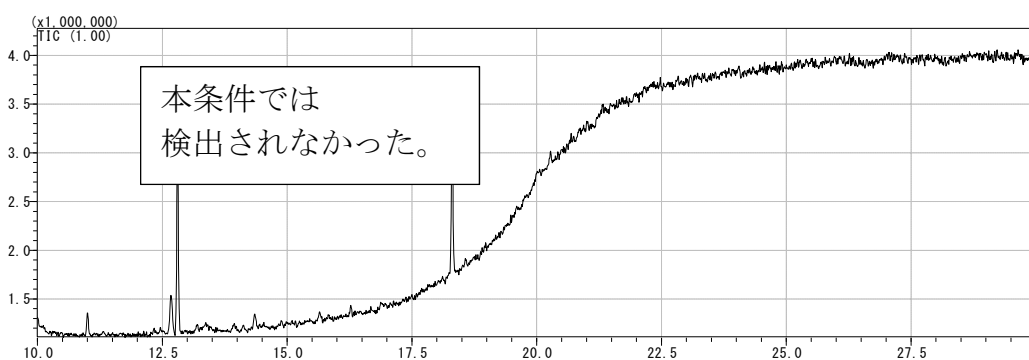


図 35 アクリル酸ドデシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

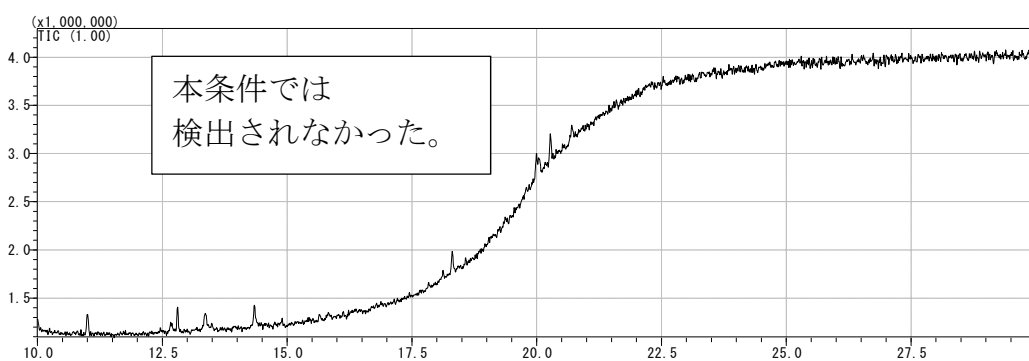


図 36 アクリル酸オクタデシルのクロマトグラム(SCAN) 50 ng/mL

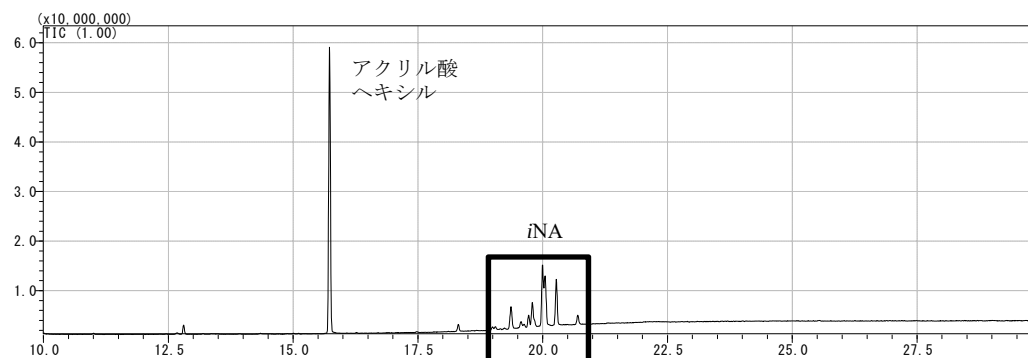


図 37 アクリル酸ヘキシルとアクリル酸イソノニルの混合クロマトグラム
各 50 ng/mL

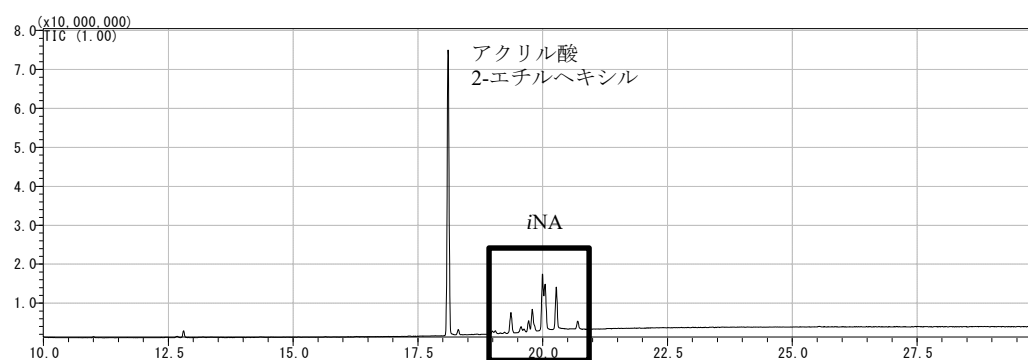


図 38 アクリル酸2-エチルヘキシルとアクリル酸イソノニルの混合クロマトグラム
各 50 ng/mL

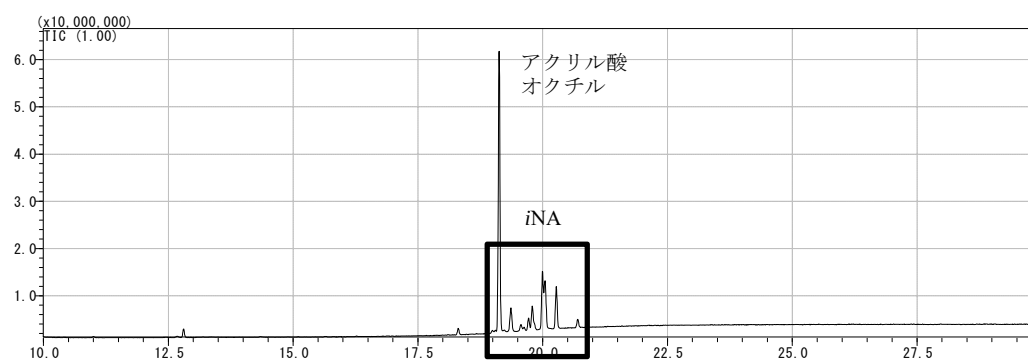


図 39 アクリル酸オクチルとアクリル酸イソノニルの混合クロマトグラム
各 50 ng/mL

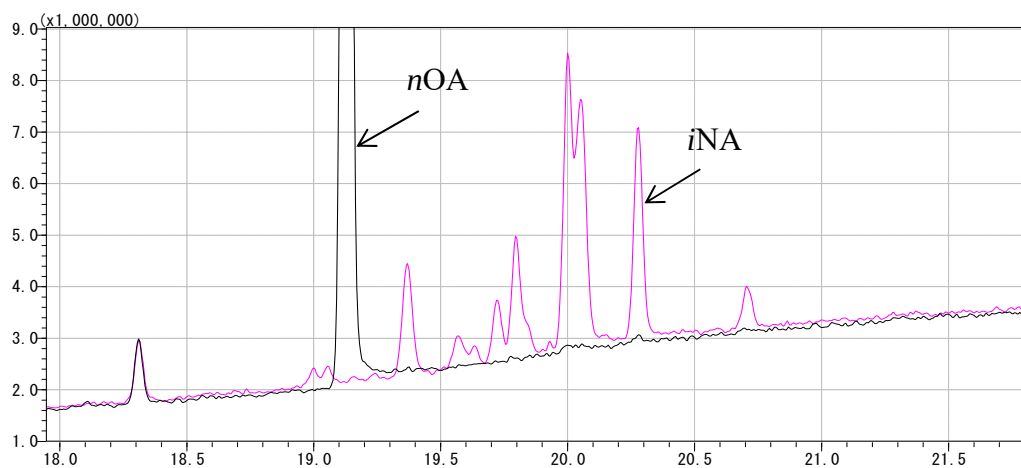


図 40 アクリル酸オクチル、アクリル酸イソノニルの
クロマトグラム(SCAN)拡大 各 50 ng/mL

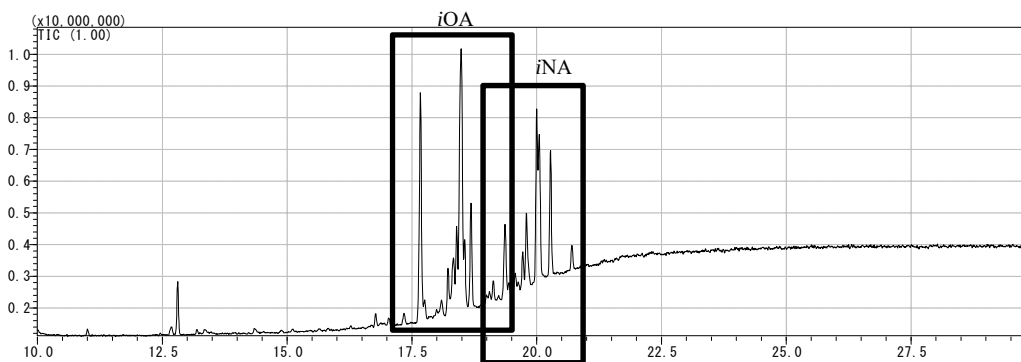


図 41 アクリル酸イソオクチル、アクリル酸イソノニルの
クロマトグラム(SCAN) 各 50 ng/mL

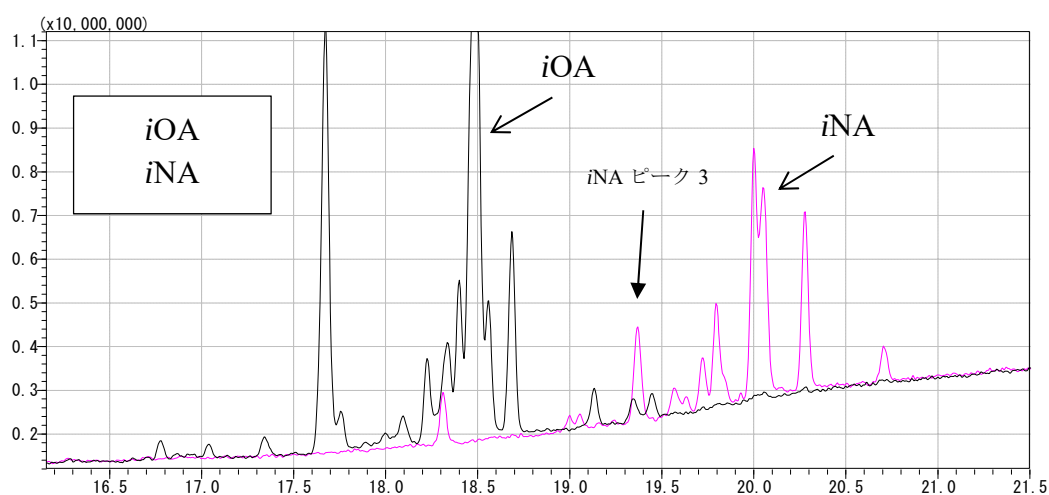


図 42 アクリル酸イソオクチル、アクリル酸イソノニルの
クロマトグラム(SCAN)拡大 各 50 ng/mL

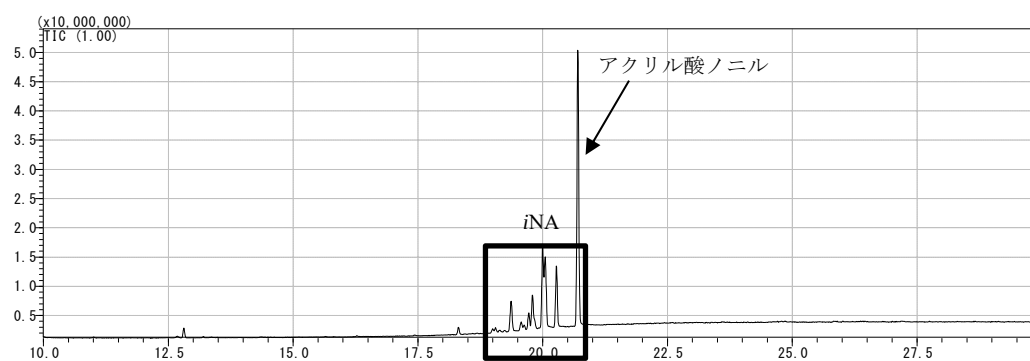


図 43 アクリル酸ノニルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム(SCAN)
各 50 ng/mL

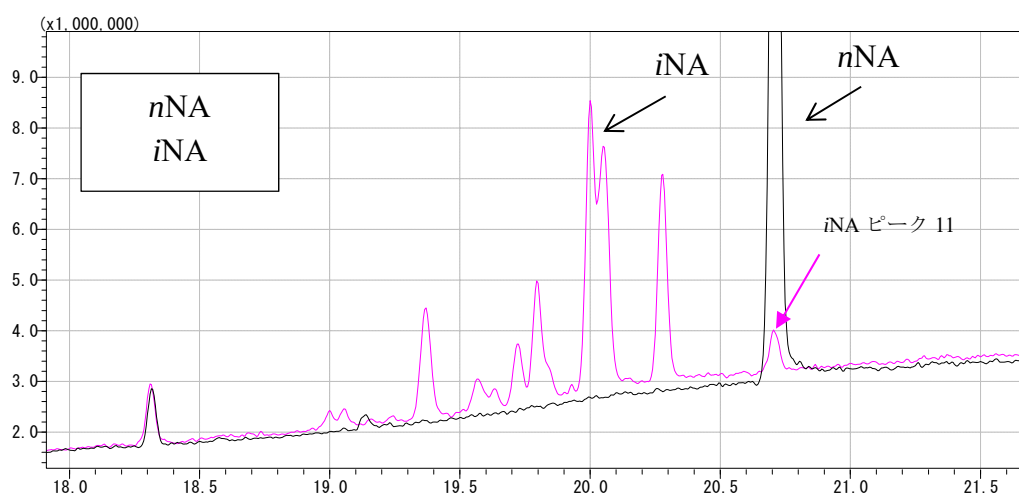


図 44 アクリル酸ノニルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム(SCAN)
拡大 各 50 ng/mL

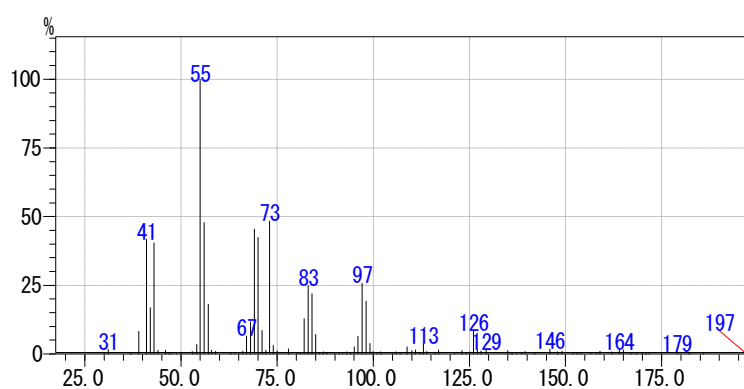


図 45 アクリル酸イソノニル (ピーク 11) のマススペクトル

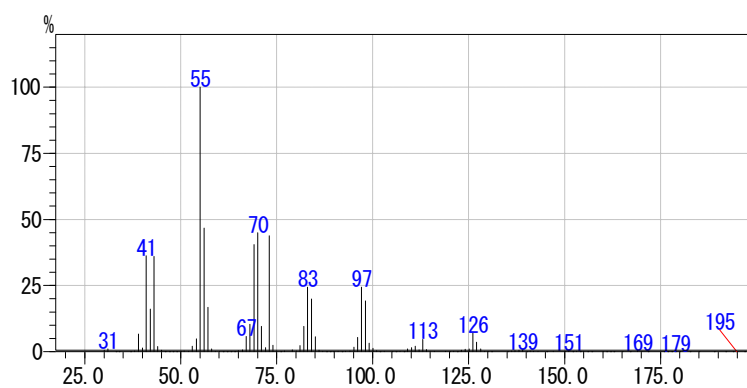


図 46 アクリル酸ノニルのマススペクトル

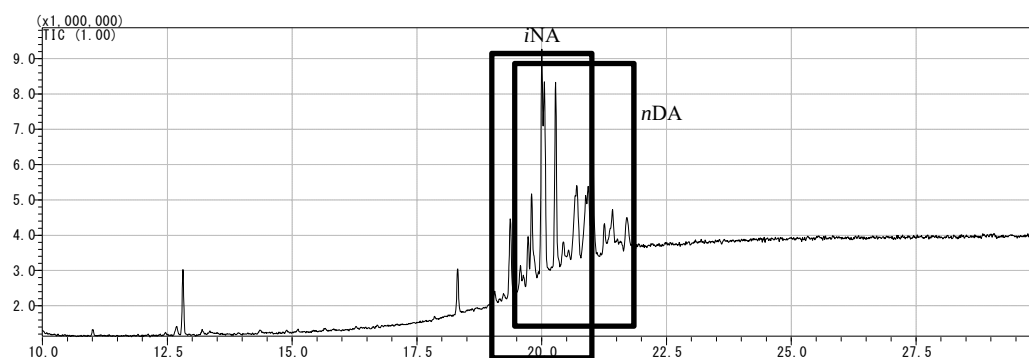


図 47 アクリル酸デシルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム(SCAN)
各 50 ng/mL

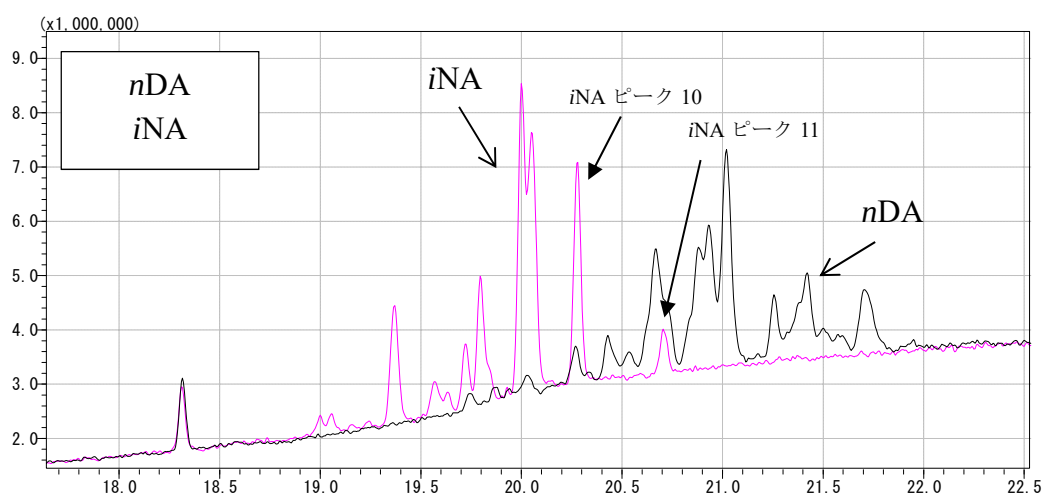


図 48 アクリル酸デシルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム(SCAN)
拡大 各 50 ng/mL

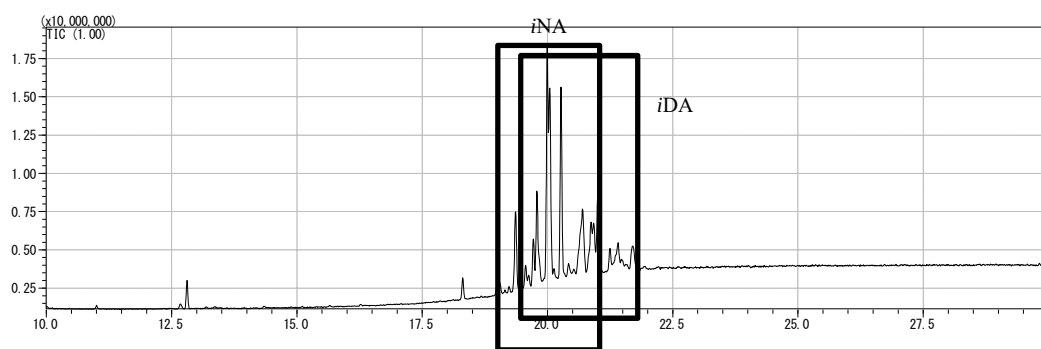


図 49 アクリル酸イソデシルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム (SCAN) 各 50 ng/mL

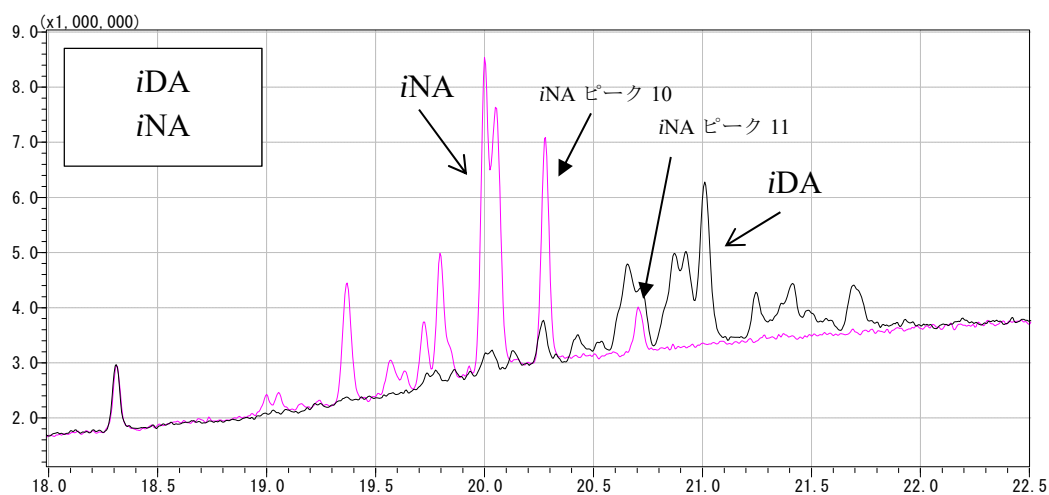


図 50 アクリル酸イソデシルとアクリル酸イソノニルのクロマトグラム (SCAN)拡大 各 50 ng/mL

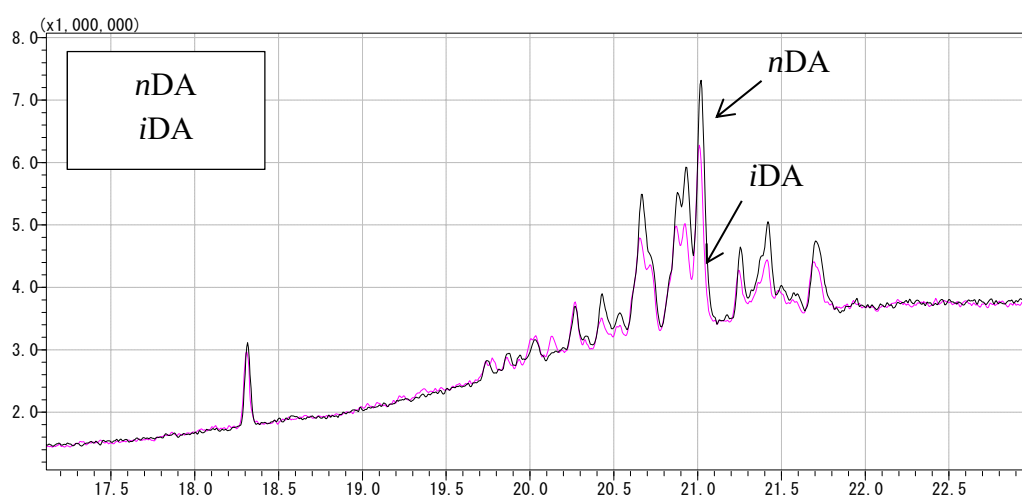


図 51 アクリル酸イソデシルとアクリル酸デシルのクロマトグラム (SCAN)拡大 各 50 ng/mL

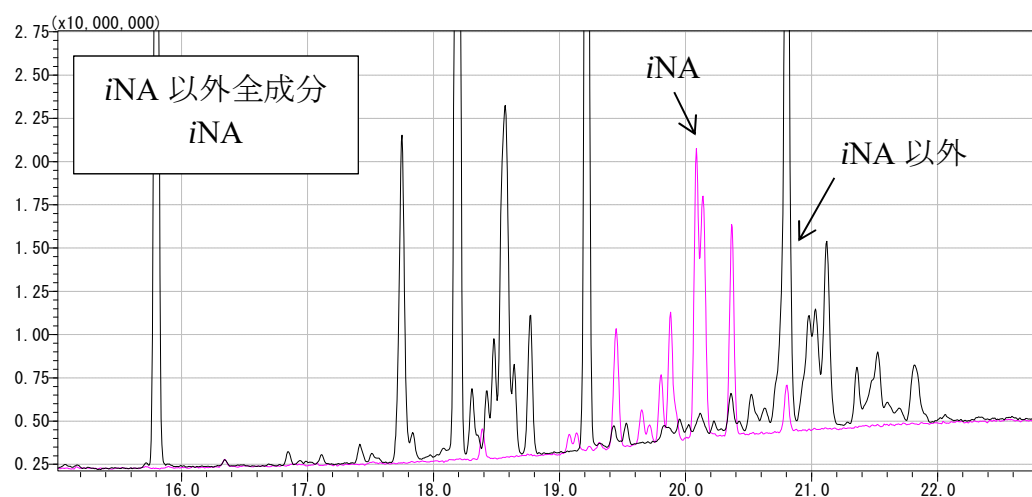


図 52 アクリル酸イソノニルとアクリル酸イソノニル以外全成分の
クロマトグラム(SCAN)拡大 各 50 ng/mL

各アクリル酸エステル定量モニターイオンは、MS スペクトルの結果からい
ずれも強度が最も大きい m/z 55 が用いられるものと考えられる。

アクリル酸イソノニルも m/z 55 と同じであるため、クロマトグラム上での分離
が重要である。

上記分析結果のまとめを表 12 に示す。

表 12 アクリル酸イソノニルと同時測定可能なアクリル酸エステル一覧

物質名	同時測定 可否判断	対応 図番号	備考
アクリル酸 ヘキシル	可能	24、25、 37	分離十分で同時測定可能。
アクリル酸 オクチル (nOA)	可能	28、29、 39、40	保持時間は近いが、iNA の主ピークである No.3、6～10 とは重ならない。
アクリル酸 イソオクチル (iOA)	可能	32、41、 42	iNA のピーク No.3 と重なるピークがあるが、iOA の主ピークではなく、影響度合いが低いため、同時測定可能と判断した。
アクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHA)	可能	26、27、 38	分離十分で同時測定可能。
アクリル酸 n-ノニル (nNA)	可能	30、31、 43、44、 45、46	保持時間は近く、一部ピークが重なるが、iNA 主ピークである No.3、6～10 とは重ならない。
アクリル酸 n-デシル (nDA)	可能	33、47、 48、51	nDA と iDA は同じクロマトグラムが得られた。一部ピークが iNA の No.10 と重なるが、nDA と
アクリル酸 イソデシル (iDA)	可能	34、49、 50、51	iDA の主ピークではなく、影響度合いが低いため、同時測定可能と判断した。
アクリル酸 ドデシル (nDoA)	不可	35	本分析法では検出されない。
アクリル酸 オクタデシル	不可	36	本分析法では検出されない。

【評価】

環境水中に含まれるアクリル酸イソノニルの定量分析法を開発した。本分析法で用いたヘッドスペース-GC/MS法でのアクリル酸イソノニルのIDLは0.0047 ng/mLであり、0.050～10 ng/mLの範囲で検量線の直線性が確認された。また、本分析法のMDLは0.0082 µg/L、MQLは0.021 µg/Lであった。

河川水及び海水 10 mL にアクリル酸イソノニルを 0.01 µg 添加した時の回収率はそれぞれ 90.5%、105%で、変動係数は 3.9%と 1.1%であった。また、本分析法で北九州市内の河川水（奥畑川）及び海水（恒見沖）を測定したところ、いずれも検出されなかった。

以上の結果から本分析法の水質試料中に含まれるアクリル酸イソノニルは、検量線最低濃度から換算して 0.05 µg/L レベルの定量に適用可能であると判断される。

【担当連絡先】

所属先名称：日鉄テクノロジー株式会社

所属住所：〒671-1123 兵庫県姫路市広畑区富士町1番地

TEL：079-278-5594 FAX：079-278-5020

担当者名：吉田 悠祐、和田 光弘、宮崎 徹

E-mail：wada.mitsuhiro.57m@nstec.nipponsteel.com

yoshida.yusuke.d4k@nstec.nipponsteel.com

miyazaki.toru.gs4@nstec.nipponsteel.com

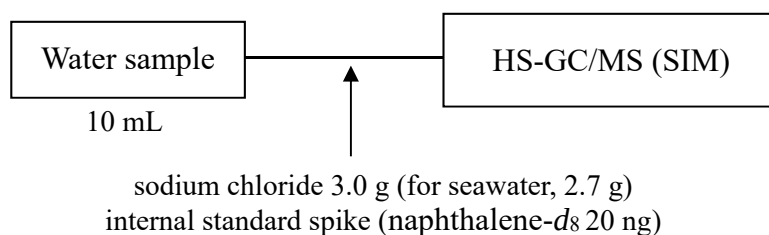
Isononyl acrylate

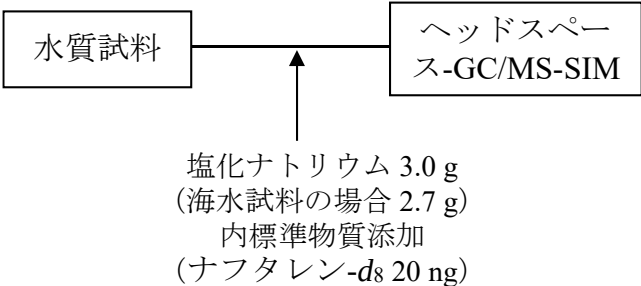
This method provides a procedure for the determination of isononyl acrylate in water samples by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Selected ion monitoring (HS-GC/MS(SIM)).

After 20 ng of naphthalene-*d*₈ as an internal standard and 3.0 g of Sodium Chloride (for seawater, 2.7 g) are spiked into 10 mL of a water sample, the solution is analyzed by HS-GC/MS (SIM).

The method detection limits (MDL) of isononyl acrylate in water sample was 0.0082 µg/L. The average percent recoveries (and percent relative standard deviations) of isononyl acrylate in seawater and river water spiked 0.010 µg of isononyl acrylate were 105% (1.1%) and 90.5% (3.9%), respectively.

Isononyl acrylate were not detected in seawater (Tunemi oki) and river water (Okubata river) by the method.



物質名	分析法フローチャート	備考
アクリル酸イソノニル(iNA) IUPAC 名 : 7-methyloctyl prop-2-enoate 別名 : イソノニル = アクリラート	【水質】  <pre> graph LR A[水質試料] --> B(()) B --> C[ヘッドスペース-GC/MS-SIM] D["塩化ナトリウム 3.0 g (海水試料の場合 2.7 g) 内標準物質添加 (ナフタレン-d8 20 ng)"] --> B </pre>	分析原理 : ヘッドスペース-GC/MS(SIM) 検出限界 : 【水質】 (μg/L) 0.0082 分析条件 : 機器 HS - GC/MS : Shimadzu 2010 Plus カラム Restek 製 Rtx-624 60 m×0.32 mm, 1.8 μm

アクリル酸 *n*-オクチル

***n*-Octyl acrylate**

IUPAC 名：Octyl prop-2-enoate

別名：オクチル=アクリラート

Acrylic acid *n*-octyl ester

アクリル酸イソオクチル

Isooctyl acrylate

IUPAC 名：Isooctyl prop-2-enoate

別名：イソオクチル=アクリラート

Acrylic acid, isooctyl ester

アクリル酸 2-エチルヘキシル

2-Ethylhexyl acrylate

IUPAC 名：2-Ethylpropyl prop-2-enoate

別名：2-エチルヘキシル=アクリラート

Acrylic acid, 2-ethylhexyl ester

メタクリル酸 2-エチルヘキシル

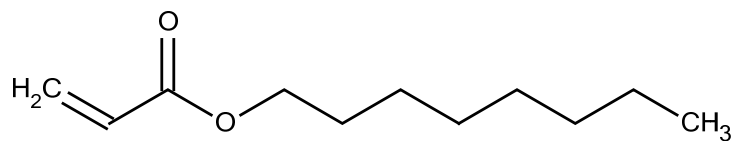
2-Ethylhexyl methacrylate

IUPAC 名：2-Ethylhexyl 2-methylprop-2-enoate

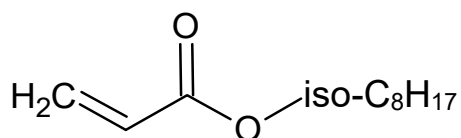
別名：2-エチルヘキシル=メタクリラート

Methacrylic acid, 2-ethylhexyl ester

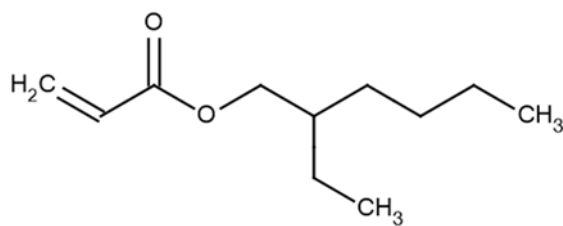
【対象物質の構造】



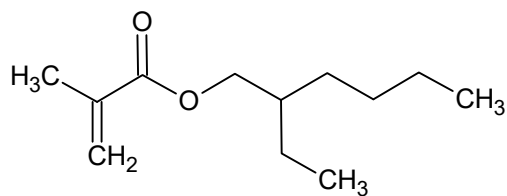
アクリル酸 *n*-オクチル (*n*OA)
CAS 番号 : 2499-59-4、分子式 : C₁₁H₂₀O₂



アクリル酸イソオクチル (*i*OA)
CAS 番号 : 29590-42-9、分子式 : C₁₁H₂₀O₂



アクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHA)
CAS 番号 : 103-11-7、分子式 : C₁₁H₂₀O₂



メタクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHM)
CAS 番号 : 688-84-6、分子式 : C₁₂H₂₂O₂

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モノアイソトピック質量)	沸点 (°C)	融点 (°C)	蒸気圧 (Pa, 20°C)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
nOA	184.28	-	-	-	-	-
iOA ¹⁾	(184.146)	196.8	-	133.3(25°C)	10	3.93
2EHA ²⁾		213.5	-90	19(20°C)	-	6.84
2EHM ^{2) 3)}	198.31 (198.161)	224	-	133(20°C)	5.92	4.54

【毒性、用途】

[実験動物に対する急性毒性情報] ⁴⁾

物質名	毒性 (LD ₅₀ , mg/kg)			用途
nOA	-	-	-	塗料、粘着剤、接着剤原料、樹脂改質剤
iOA	-	-	-	粘着剤、接着剤原料
2EHA	-	-	-	アクリル繊維、塗料、接着剤原料
2EHM	ラット	経口	> 2,000	塗料、被覆材料、接着剤原料、潤滑油添加剤

出典

- 1) 国際化学物質安全性カード(ICSC)
- 2) IPCS, International Programme on Chemical Safety (2002) ICSC, International Chemical Safety Cards, Geneva.
- 3) PhysProp Database, Syracuse Research Corporation
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

§1 分析法

(1) 分析法の概要

塩化ナトリウムを入れたバイアル瓶に水質試料を採り、内標準を添加してヘッドスペース-GC/MS-SIM で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】（注 1）

アクリル酸オクチル (nOA)	: 東京化成工業製 (>99.0%)
アクリル酸イソオクチル (iOA)	: シグマアルドリッチ製 (>90%)
アクリル酸 2-エチルヘキシル(2EHA)	: 東京化成工業製 (>99.0%)
メタクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHM)	: 東京化成工業製 (>99.0%)
アクリル酸 2,2,3,3-テトラフルオロプロ ピル-1- ¹³ C,2,3,3- ^d ₃ (TFPA- ¹³ C, ^d ₃)	: 大陽日酸製 (>97%)
メタノール	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
塩化ナトリウム	: 富士フイルム和光純薬製水質試験用
L(+)-アスコルビン酸	: 富士フイルム和光純薬製 特級
精製水（注 2）	: エビアン 伊藤園・伊藤忠ミネラル ウォーターズ

【標準液の調製】

〔標準原液〕

各標準品を 20.0 mg 正確に量り取り、メタノール 50 mL に溶解し、400 µg/mL の標準原液を調製する。

〔内標準液〕

アクリル酸 2,2,3,3-テトラフルオロプロピル-1-¹³C,2,3,3-^d₃ を 20.0 mg 正確に量り取り、アセトニトリル 50 mL に溶解し、400 µg/mL の内標準原液を調製する。内標準原液をメタノールで希釈し、0.50 µg/mL の内標準液を調製する。

〔検量線用混合標準液〕

各標準原液をメタノールで希釈し、0.50 µg/mL の検量線用混合標準液を調製する（注 3）。

【器具】

バイアルビン（ヘッドスペース測定用(20 mL)）、シリコン/PTFE セプタム付きキャップ、メスフラスコ、ホールピペット、マイクロシリンジ（注 4）

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)における「試料の採取及び検体の調製等」に従う。試料は、容量 100 mL 程度のふらん瓶またはシリコン/PTFE セプタム付きねじ口瓶に、気泡が入らないように採取する。

分析は試料採取後直ちに行うことが原則であるが、行えない場合は、1.0 g/L 相当になるようにアスコルビン酸を添加し、汚染のない冷暗所 (10°C 以下) にて凍結しないように保存する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 10 mL を泡立てないよう、あらかじめ塩化ナトリウム 3.0 g (試料が海水の場合 2.7 g) を入れたヘッドスペース測定用バイアル瓶に分取する。直ちに、内標準液 10 µL を添加して密栓する。塩化ナトリウムが完全に溶解するまで混合したものを試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】に従って調製したものを空試験液とする。

【測定】

【GC/MS 測定条件】

【GC/MS 条件】(注 5)

使用機種	: SHIMADZU 製 GCMS-TQ8030
カラム	: Restek 製 Rtx-624 (60 m × 0.25 mm, 1.4 µm)
カラム温度	: 40°C(1 min)→10°C/min→220°C (7 min)
注入方法	: スプリット (スプリット比 5:1)
キャリアーガス	: ヘリウム (31.2 cm/s)
イオン源温度	: 220°C
イオン化電流	: 60 µA
イオン化電圧	: 70 eV
測定モード	: SIM

[ヘッドスペース条件]

使用機種 : SHIMADZU 製 HS-20 Trap
 平衡条件 : 70°C, 30 min
 試料導入方式 : ループ注入 (1 mL)
 トランスファー温度 : 200°C

物質名	モニターイオン (m/z)	
	定量	確認
アクリル酸 <i>n</i> -オクチル	55	83, 112
アクリル酸イソオクチル	55	83, 112
アクリル酸 2-エチルヘキシル	55	83, 112
メタクリル酸 2-エチルヘキシル	69	83, 112
TFPA- ¹³ C, ₃	59	89

[検量線]

精製水 10 mL を泡立てないように、あらかじめ塩化ナトリウム 3.0 g を入れたヘッドスペース測定用バイアル瓶に分取する。直ちに、0.50 µg/mL の検量線用混合標準液 1.0~40 µL 及び 0.50 µg/mL の内標準液 10 µL を添加し、密栓する。塩化ナトリウムが完全に溶解するまで混合した後、ヘッドスペース-GC/MS-SIM で測定する。対象物質と内標準の濃度比及び得られたピーク面積比を用いて検量線を作成する。分岐鎖異性体混合物であるアクリル酸イソオクチルについては、後述の図 10 に示す成分ピーク 5 本（ピーク①～⑤）が測定対象となり、各ピーク面積の総和と内標準のピーク面積比で検量線を作成する。

[定量]

試験液 10 mL をヘッドスペース-GC/MS を用いて測定し、得られた対象物質と内標準物質のピーク面積比から検量線を用いて対象物質濃度を求める。

[濃度の算出]

試料水中濃度 C (ng/L) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めた内標準物質濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料中に添加した内標準の量 (ng)

(= 添加する内標準の濃度 (ng/µL) × 添加する内標準の容量 (µL))

V : 試料水量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 5.0 \text{ (ng)}$$

(= 添加内標準の濃度 (0.5 ng/μL) × 添加内標準の容量 (10 μL))

$$V = 0.010 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 500 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限 (IDL) 〕

本分析法に用いたヘッドスペース-GC/MS の IDL を表 1 に示す (注 6)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	試料量 (L)	IDL (ng/mL)
アクリル酸 <i>n</i> -オクチル	0.010	0.017
アクリル酸イソオクチル	0.010	0.057
アクリル酸 2-エチルヘキシル	0.010	0.023
メタクリル酸 2-エチルヘキシル	0.010	0.017

〔分析方法の検出下限 (MDL)及び定量下限 (MQL)〕

本分析法の MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 8)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料	試料量 (L)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
アクリル酸 <i>n</i> -オクチル	河川水	0.010	0.014	0.037
アクリル酸イソオクチル	河川水	0.010	0.073	0.19
アクリル酸 2-エチルヘキシル	河川水	0.010	0.015	0.039
メタクリル酸 2-エチルヘキシル	河川水	0.010	0.019	0.049

注 解

- (注1) 使用する試薬類、器具類は、あらかじめブランクが無いことを確認しておく。(2) 試薬・器具の項で挙げたものは、使用可能であった物の一例である。空試験の結果、ブランクが認められた場合は、その由来を確認する。
- (注2) 使用する精製水は、あらかじめブランクが無いことを確認しておく。精製水に起因するブランクを差し引くことはできない。なお、精製水にはエビアン、超純水（富士フイルム和光純薬製、LCMS 分析用）が使用可能であった。
- (注3) アクリル酸イソオクチルの定量は、図 10 に示すように *n*OA 及び 2EHA を除くピーク①～⑤の面積の総量から求めることとした。ただし、アクリル酸イソオクチル標準液は、*n*OA 及び 2EHA を含んでいるため混合標準液を調製する際は注意を要する（アクリル酸イソオクチルとそれ以外で別の混合標準液とする。）。
- (注4) マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。また、ガラス器具は JIS R 3505 に記載のクラス A のものを使用する。
- (注5) ヘッドスペース-GC/MS の条件は、本測定に使用した機種（島津製作所製 HS-20 Trap+GCMS-TQ8030）特有のものである。機種によって最適条件が異なる。
- (注6) IDL は、「化学物質環境実態調査の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って算出した。算出結果を表 3 に、測定時のクロマトグラムを図 1-1 及び図 1-2 に示す。
- (注7) アクリル酸イソオクチル(*i*OA)の IDL 算出に当たっては、混合物であるため、図 10 中のピーク④を基準として算出した。

表 3 IDL の算出結果

物質名	nOA	2EHA	2EHM	iOA
試料量(L)	0.010	0.010	0.010	0.010
試料濃度(ng/mL)	0.050	0.050	0.050	0.20
結果 1 (ng/mL)	0.0452	0.0426	0.0477	0.176
結果 2 (ng/mL)	0.0468	0.0429	0.0487	0.182
結果 3 (ng/mL)	0.0513	0.0585	0.0497	0.178
結果 4 (ng/mL)	0.0441	0.0502	0.0437	0.202
結果 5 (ng/mL)	0.0418	0.0452	0.0378	0.168
結果 6 (ng/mL)	0.0421	0.0414	0.0411	0.209
結果 7 (ng/mL)	0.0532	0.0474	0.0477	0.182
平均値(ng/mL)	0.04636	0.04689	0.04520	0.1854
標準偏差(σ_{n-1}) (ng/mL)	0.00441	0.00596	0.00445	0.0147
IDL(ng/mL)	0.017	0.023	0.017	0.057
S/N	12	27	15	7.4
CV(%)	9.5	13	9.8	7.9

* IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

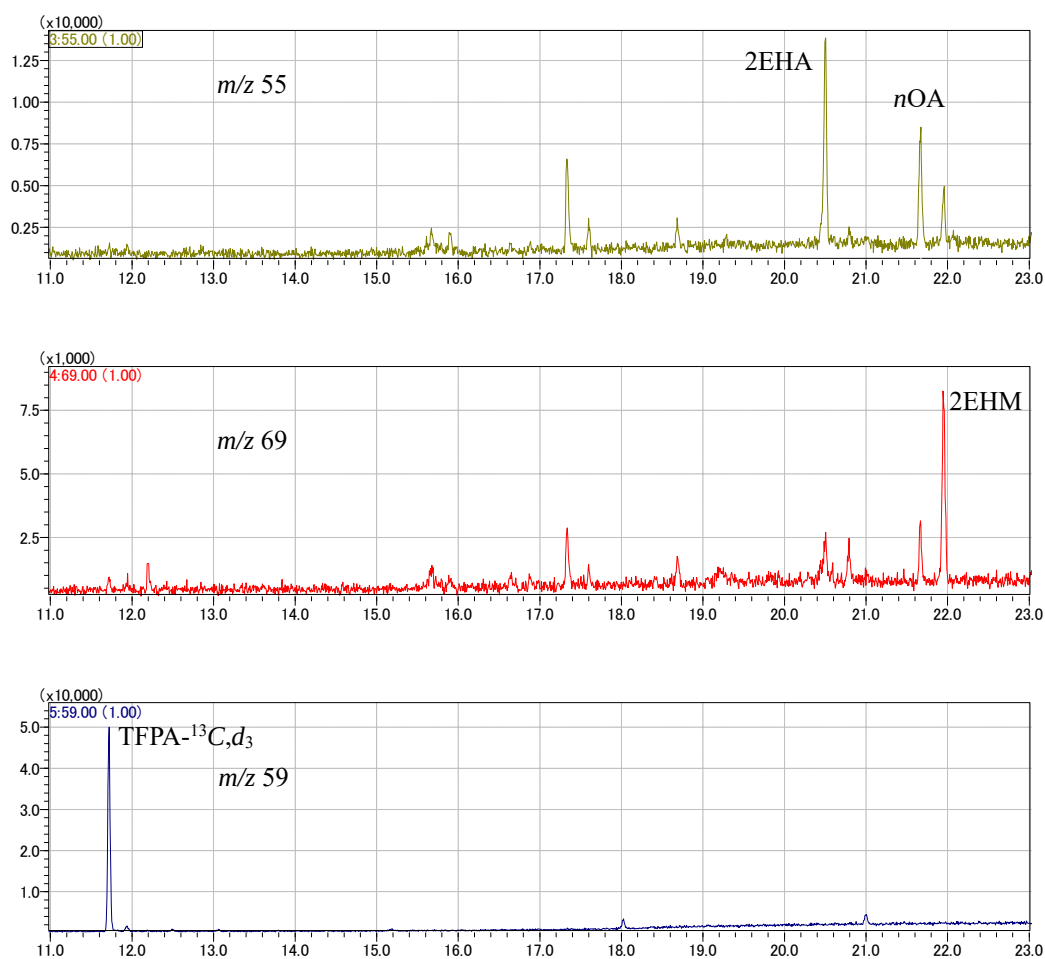


図 1-1 IDL 測定時のクロマトグラム
(アクリル酸エステル類; m/z 55、メタクリル酸エステル類; m/z 69、TFPA- $^{13}\text{C}_3\text{d}_3$; m/z 59)

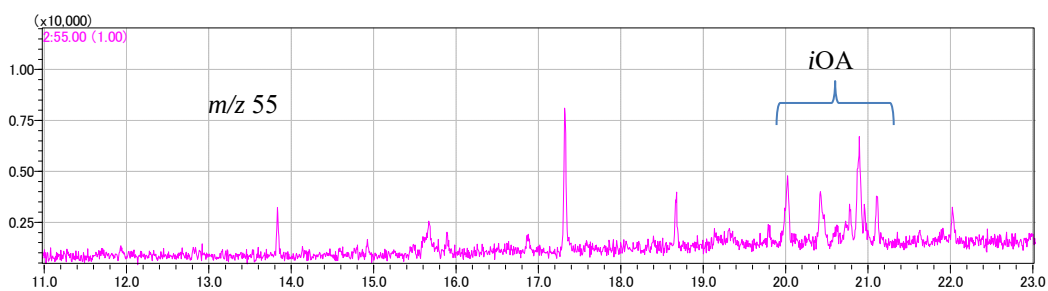


図 1-2 IDL 測定時のクロマトグラム (アクリル酸イソオクチル)

(注8) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 4 のとおり算出した。また、図 2-1 及び図 2-2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

(注9) アクリル酸イソオクチル(iOA)の MDL 算出に当たっては、混合物であるため、図 10 中のピーク④を基準として算出した。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	nOA	2EHA	2EHM	iOA
試料	河川水	河川水	河川水	河川水
試料量 (L)	0.010	0.010	0.010	0.010
標準添加量 (μg)	0.00050	0.00050	0.00050	0.0020
試料濃度 (μg/L)	0.050	0.050	0.050	0.20
操作ブランク平均 (μg/L)* ¹	<0.014	<0.015	<0.019	<0.073
無添加平均 (μg/L)* ²	<0.014	<0.015	<0.019	<0.073
結果 1 (μg/L)	0.0427 (85)	0.0345 (69)	0.0327 (65)	0.145 (72)
結果 2 (μg/L)	0.0373 (75)	0.0316 (63)	0.0336 (67)	0.182 (91)
結果 3 (μg/L)	0.0454 (91)	0.0367 (73)	0.0430 (86)	0.136 (68)
結果 4 (μg/L)	0.0441 (88)	0.0371 (74)	0.0371 (74)	0.187 (93)
結果 5 (μg/L)	0.0360 (72)	0.0258 (52)	0.0272 (54)	0.159 (79)
結果 6 (μg/L)	0.0408 (82)	0.0360 (72)	0.0358 (72)	0.151 (75)
結果 7 (μg/L)	0.0376 (75)	0.0341 (68)	0.0378 (76)	0.167 (83)
平均値 (μg/L)	0.04056 (81.1)	0.03369 (67.4)	0.03531 (70.6)	0.1608 (80.4)
標準偏差(σ _{n-1}) (μg/L)	0.00367	0.00395	0.00490	0.0188
MDL(μg/L)* ³	0.014	0.015	0.019	0.073
MQL(μg/L)* ⁴	0.037	0.039	0.049	0.19
S/N	14	22	15	7.0
CV(%)	9.0	12	14	12

*1 空試験液を測定した値の平均値 (n = 3)

*2 MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 3)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

*5 括弧内の値は回収率

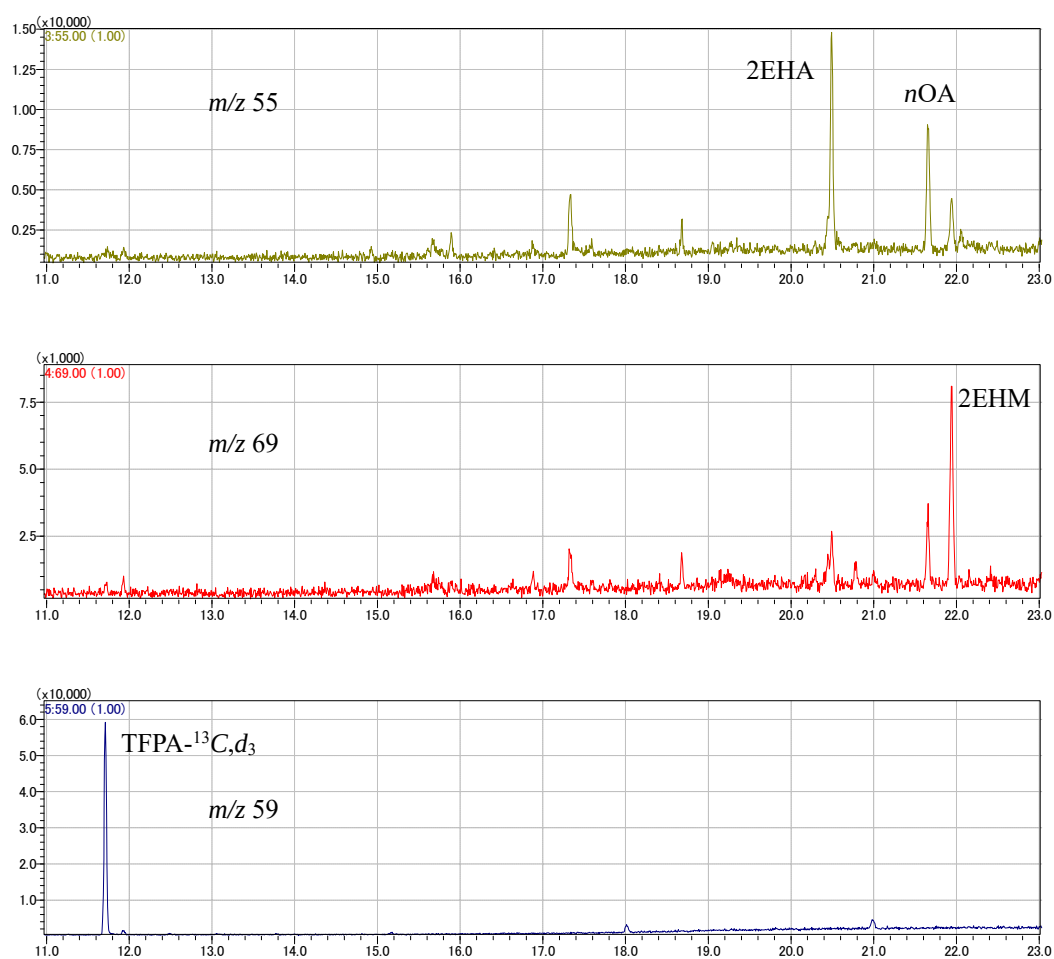


図 2-1 MDL 測定時のクロマトグラム
(アクリル酸エステル類; m/z 55、メタクリル酸エステル類; m/z 69、TFPA- $^{13}\text{C}_3\text{d}_3$; m/z 59)

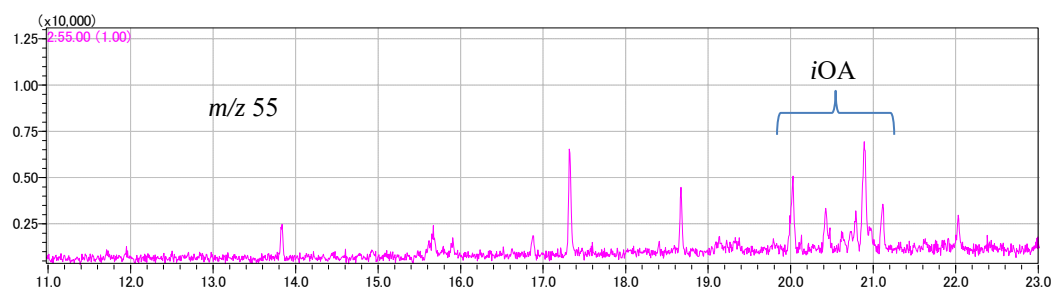


図 2-2 MDL 測定時のクロマトグラム (アクリル酸イソオクチル)

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

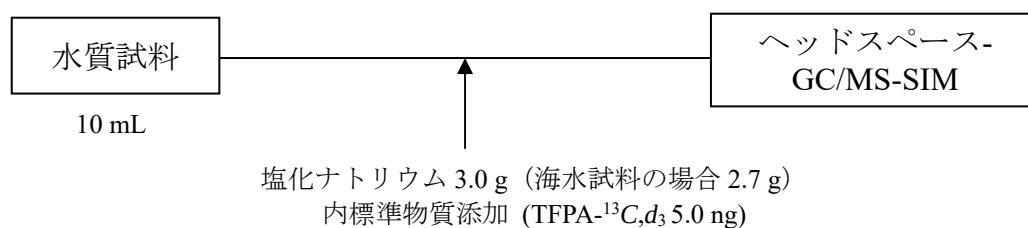


図 3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図 4-1～図 4-4 に、検量線作成用データを表 5-1～表 5-3 に示す。なお、検量線は直線性が認められる範囲で作成した。なお、アクリル酸イソオクチル(iOA)の検量線作成に当たっては、分岐鎖異性体混合物であるため、図 10 中のピーク①からピーク⑤の面積を合計し、内標準の濃度比及び得られたピーク面積比を用いて検量線を作成する。

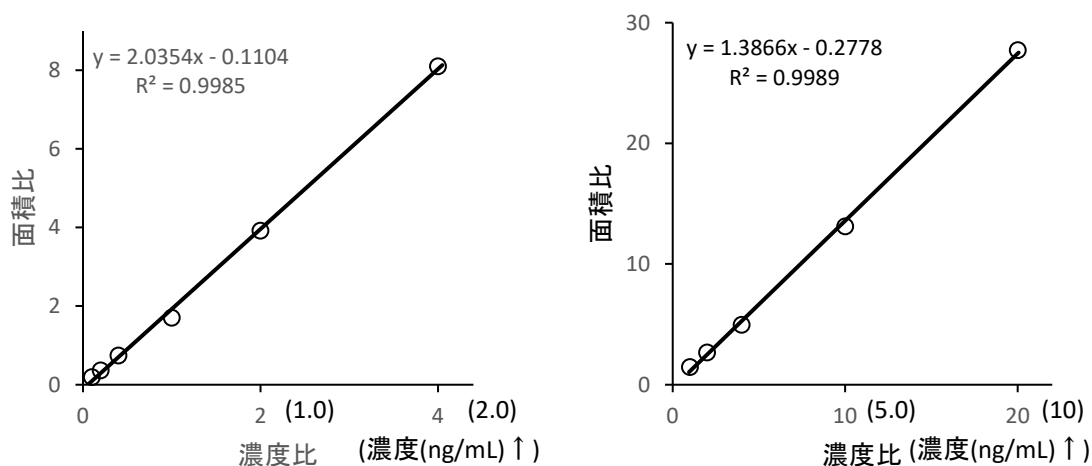


図 4-1 アクリル酸 *n*-オクチルの検量線

(濃度範囲：左図；0.050 ～ 2.0 ng/mL、右図；0.50 ～ 10 ng/mL)

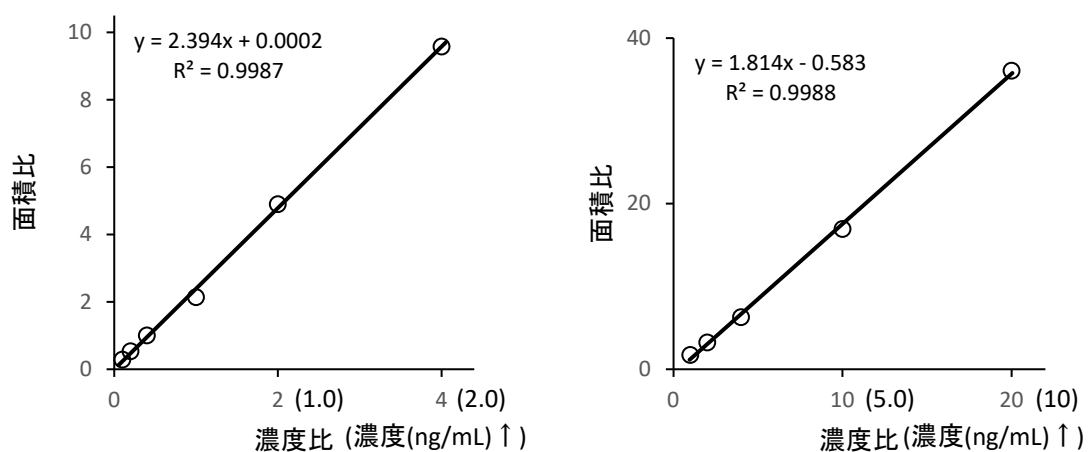


図 4-2 アクリル酸 2-エチルヘキシルの検量線
(濃度範囲：左図；0.050 ~ 2.0 ng/mL、右図；0.50 ~ 10 ng/mL)

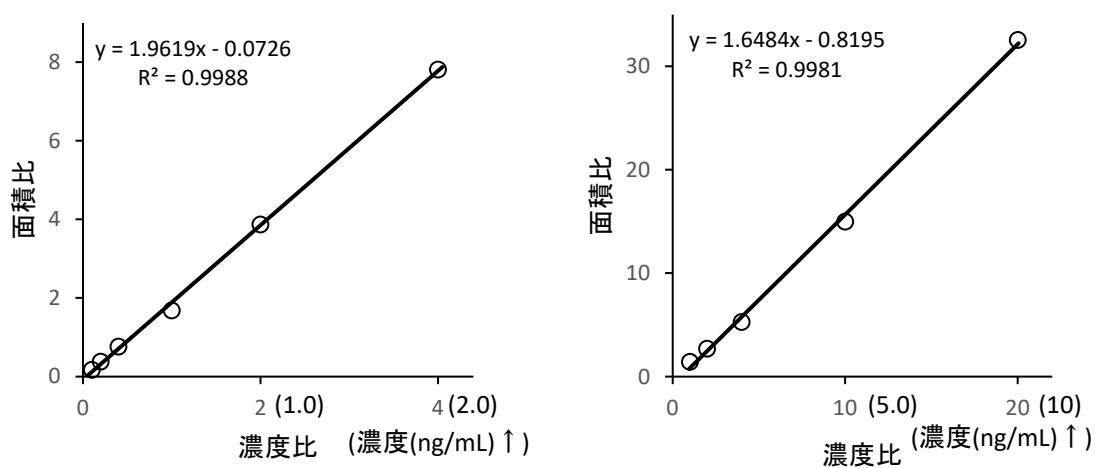


図 4-3 メタクリル酸 2-エチルヘキシルの検量線
(濃度範囲：左図；0.050 ~ 2.0 ng/mL、右図；0.50 ~ 10 ng/mL)

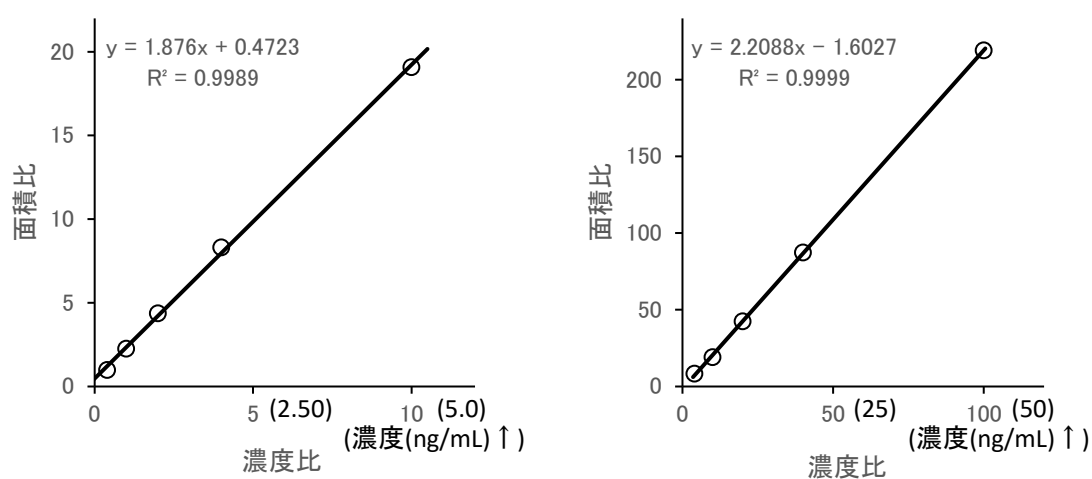


図 4-4 アクリル酸イソオクチルの検量線
(濃度範囲：左図；0.20 ～ 5.0 ng/mL、右図；2.0 ～ 50 ng/mL)

表 5-1 低濃度域の検量線作成用データ(*n*OA, 2EHA, 2EHM)

標準液濃度 (ng/mL) (C_s)	濃度比 (C_s/C_{is}^*)	応答値				応答比		
		<i>n</i> OA	2EHA	2EHM	TFPA- $^{13}C, d_3$	<i>n</i> OA	2EHA	2EHM
		(A_s)	(A_s)	(A_s)	(A_{is})	(A_s/A_{is})	(A_s/A_{is})	(A_s/A_{is})
0.050	0.10	20740	30990	18638	108601	0.191	0.285	0.172
0.10	0.20	39833	58608	41669	110206	0.361	0.532	0.378
0.20	0.40	84499	114907	87132	114375	0.739	1.005	0.762
0.50	1.0	199024	249908	196683	116845	1.70	2.14	1.68
1.0	2.0	467771	584998	461869	119449	3.92	4.90	3.87
2.0	4.0	955324	1129606	921177	117949	8.10	9.58	7.81

*：内標準物質濃度 0.50 ng/mL

表 5-2 高濃度域の検量線作成用データ(*n*OA, 2EHA, 2EHM)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} [*])	応答値				応答比		
		<i>n</i> OA (A _s)	2EHA (A _s)	2EHM (A _s)	TFPA- ¹³ C, _{d3} (A _{is})	<i>n</i> OA (A _s /A _{is})	2EHA (A _s /A _{is})	2EHM (A _s /A _{is})
0.50	1.0	152342	180141	148200	104740	1.45	1.72	1.41
1.0	2.0	294848	356816	297013	110403	2.67	3.23	2.69
2.0	4.0	582392	737644	619736	117579	4.95	6.27	5.27
5.0	10	1517838	1958608	1732128	115687	13.1	16.9	14.9
10	20	2944299	3829317	3457193	106232	27.7	36.0	32.5

* : 内標準物質濃度 0.50 ng/mL

表 5-3 検量線作成用データ(*i*OA)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} [*])	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		<i>i</i> OA(①~⑤) (A _s)	TFPA- ¹³ C, _{d3} (A _{is})	
0.20	0.40	134437	137320	0.979
0.50	1.0	276164	122642	2.25
1.0	2.0	507763	116132	4.37
2.0	4.0	948958	114153	8.31
5.0	10	2200515	115290	19.1
10	20	4540282	106986	42.4
20	40	8823988	101082	87.3
50	100	22373510	102079	219

* : 内標準物質濃度 0.50 ng/mL

〔クロマトグラム〕

アクリル酸 *n*-オクチル、アクリル酸 2-エチルヘキシルおよびメタクリル酸 2-エチルヘキシルのクロマトグラム（定量イオン）を図 5-1 に、アクリル酸イソオクチルを図 5-2 に示す。

また、それぞれの定量イオン、確認イオンのクロマトグラムを図 5-3～5-6 に示す。

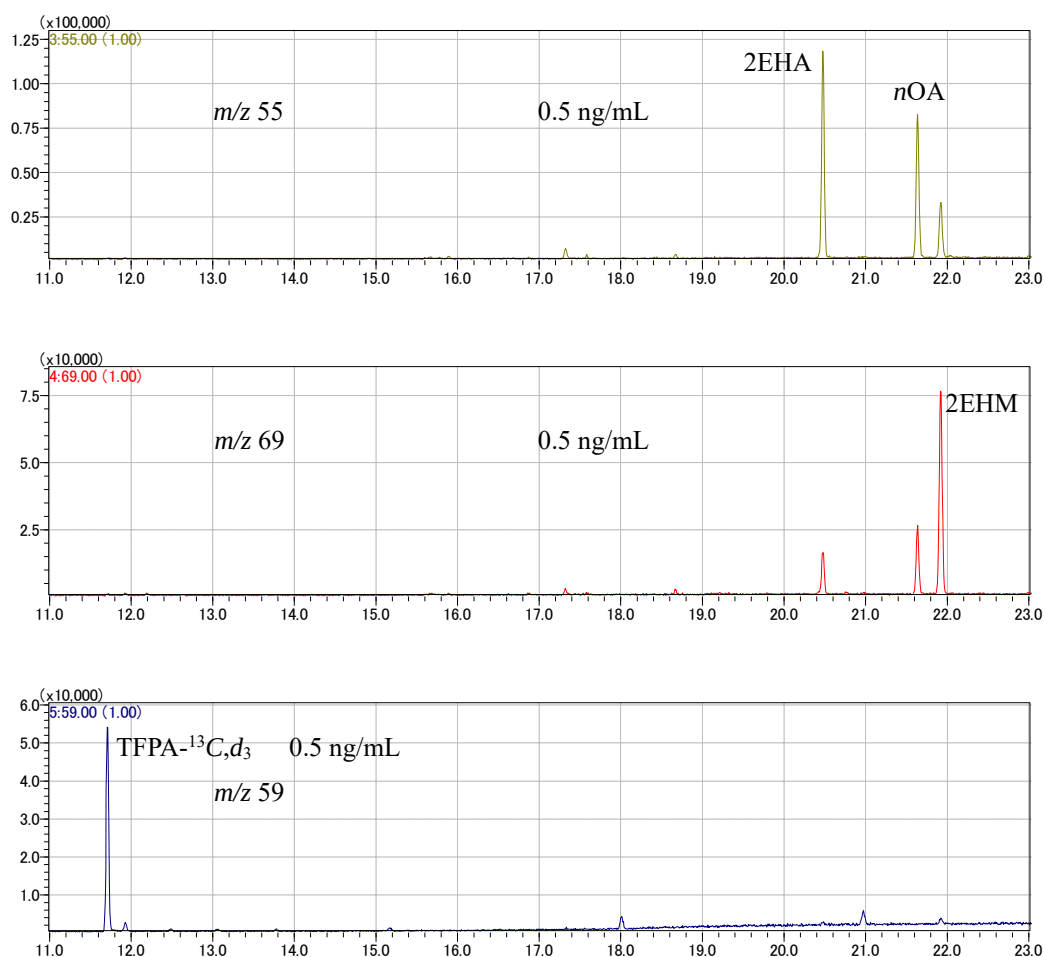


図 5-1 標準液の SIM クロマトグラム（定量イオン）

（アクリル酸エステル類; *m/z* 55、メタクリル酸エステル類; *m/z* 69、TFPA-¹³C,₃d₃; *m/z* 59）

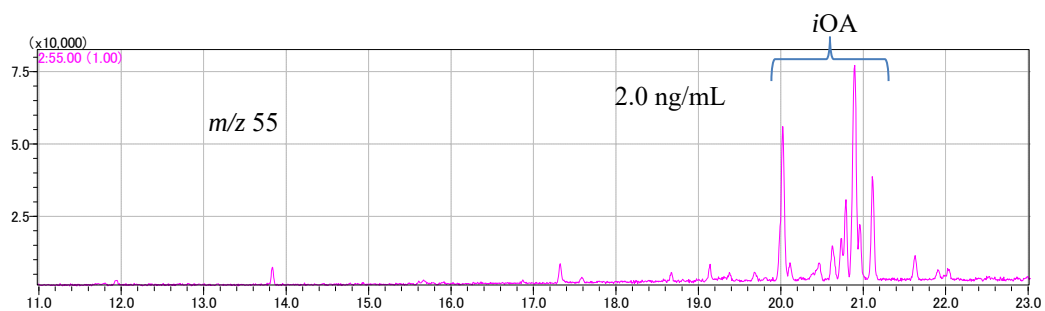


図 5-2 アクリル酸イソオクチル標準液の SIM クロマトグラム（定量イオン）

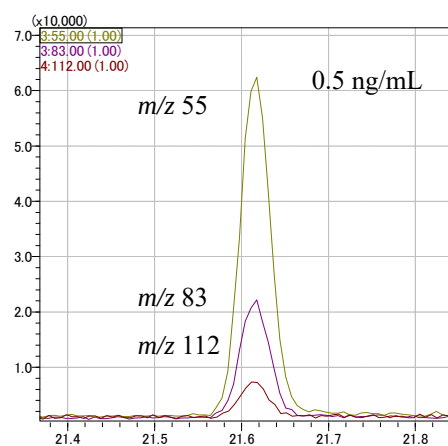


図 5-3 アクリル酸 *n*-オクチル標準液の SIM クロマトグラム

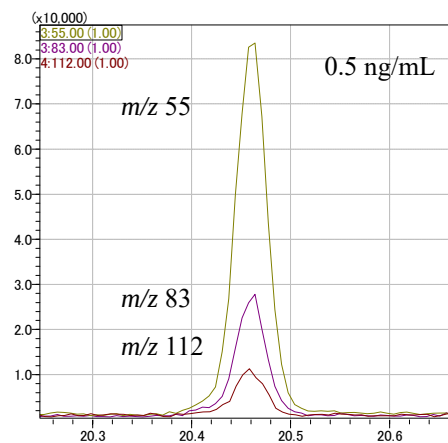


図 5-4 アクリル酸 2-エチルヘキシル標準液の SIM クロマトグラム

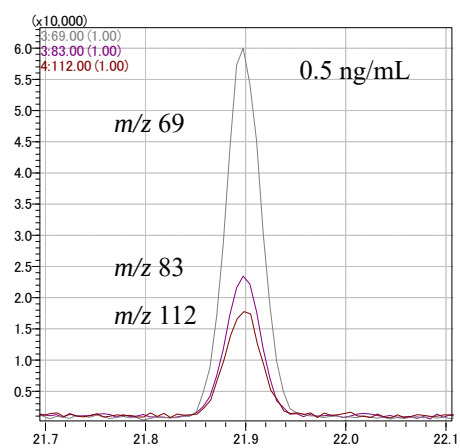


図 5-5 メタクリル酸 2-エチルヘキシル標準液の SIM クロマトグラム

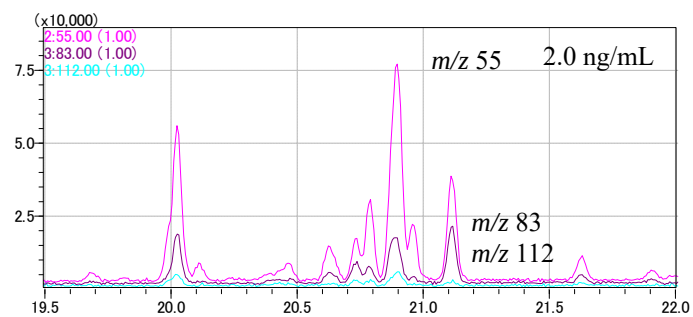


図 5-6 アクリル酸イソオクチル標準液の SIM クロマトグラム

[マススペクトル]

各標準物質のマススペクトルを図 6-1～6-5 に示す。

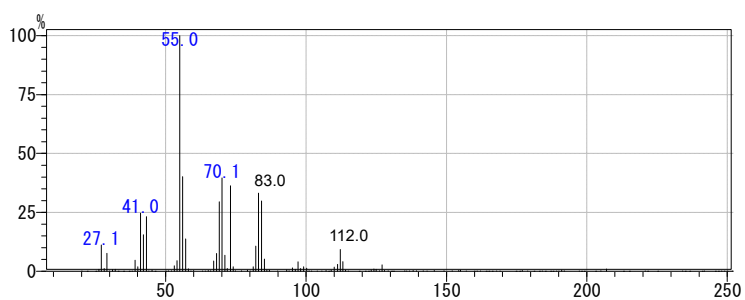


図 6-1 アクリル酸 *n*-オクチルのマススペクトル

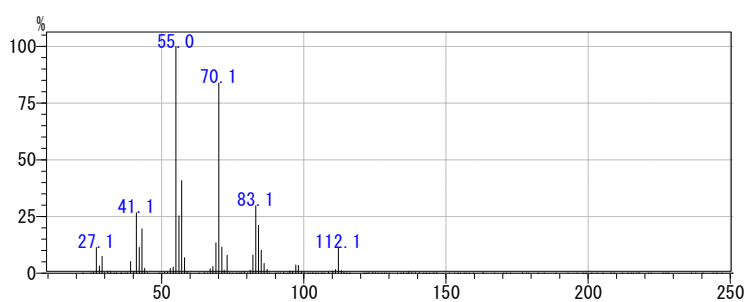


図 6-2 アクリル酸 2-エチルヘキシルのマススペクトル

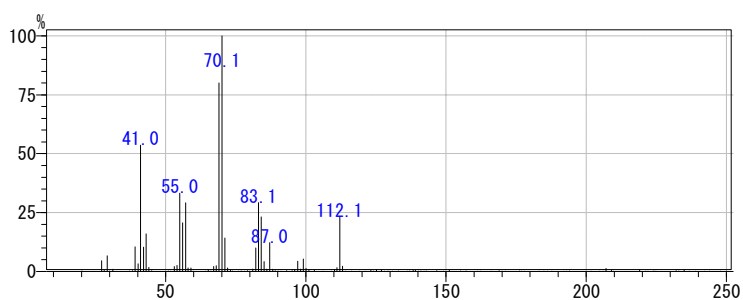


図 6-3 メタクリル酸 2-エチルヘキシルのマススペクトル

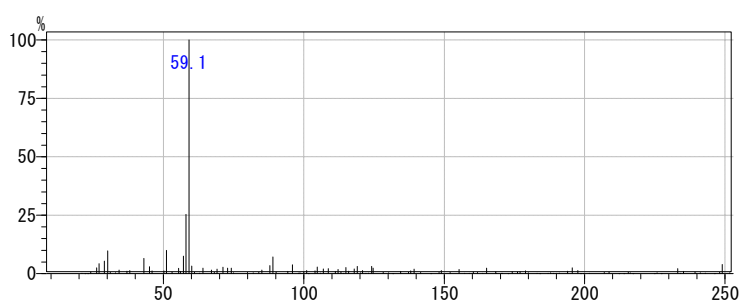


図 6-4 アクリル酸 2,2,3,3-テトラフルオロプロピル-1-¹³C,2,3,3-*d*₃ のマススペクトル

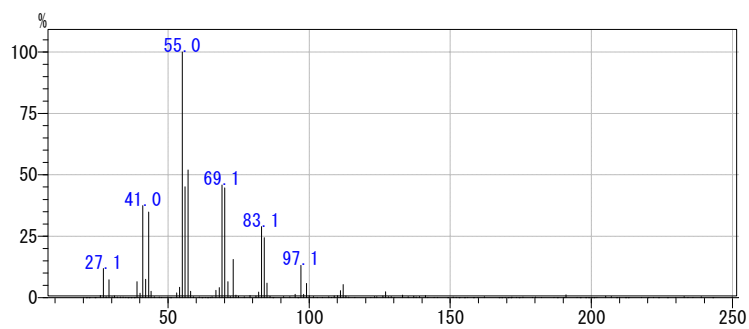


図 6-5-1 アクリル酸イソオクチル（ピーク①）のマススペクトル

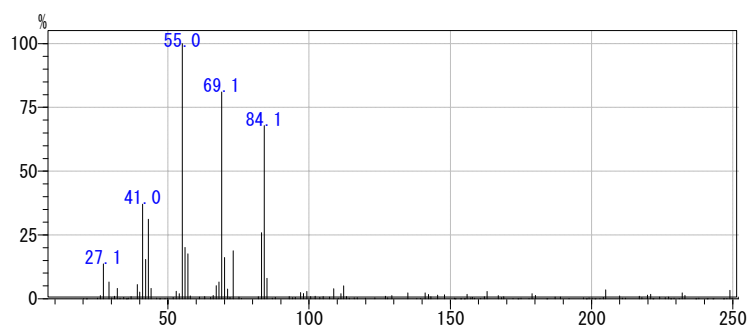


図 6-5-2 アクリル酸イソオクチル（ピーク②）のマススペクトル

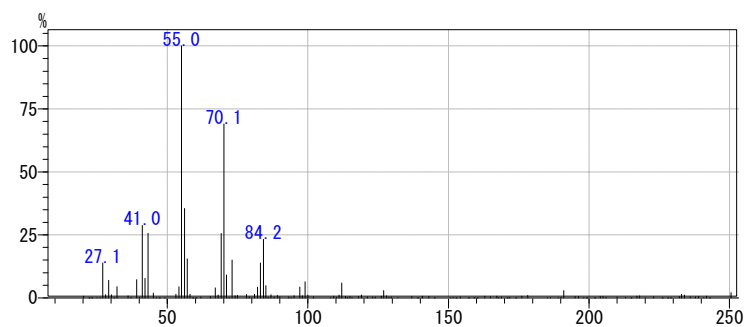


図 6-5-3 アクリル酸イソオクチル（ピーク③）のマススペクトル

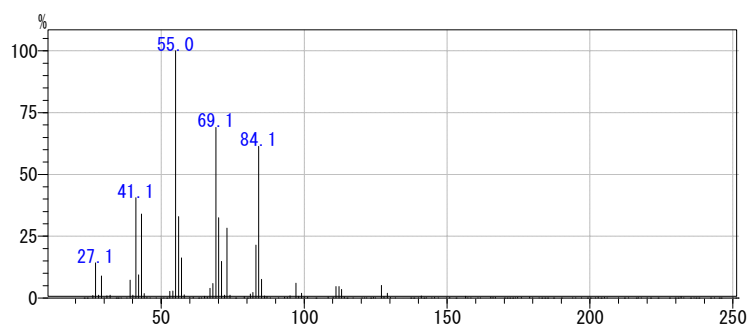


図 6-5-4 アクリル酸イソオクチル（ピーク④）のマススペクトル

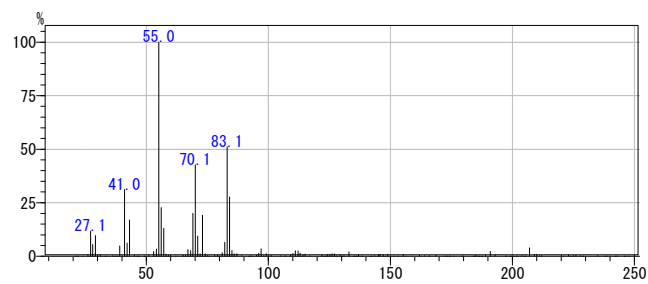


図 6-5-5 アクリル酸イソオクチル（ピーク⑤）のマスペクトル

〔操作ブランク〕

操作ブランク試験の結果はいずれも MDL 未満であった（表 6）。操作ブランクのクロマトグラフを図 7 に示す。

表 6 操作ブランク試験結果

物質名	試験数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)
アクリル酸 <i>n</i> -オクチル	2	< 0.014
アクリル酸イソオクチル	2	< 0.073
アクリル酸 2-エチルヘキシル	2	< 0.015
メタクリル酸 2-エチルヘキシル	2	< 0.019

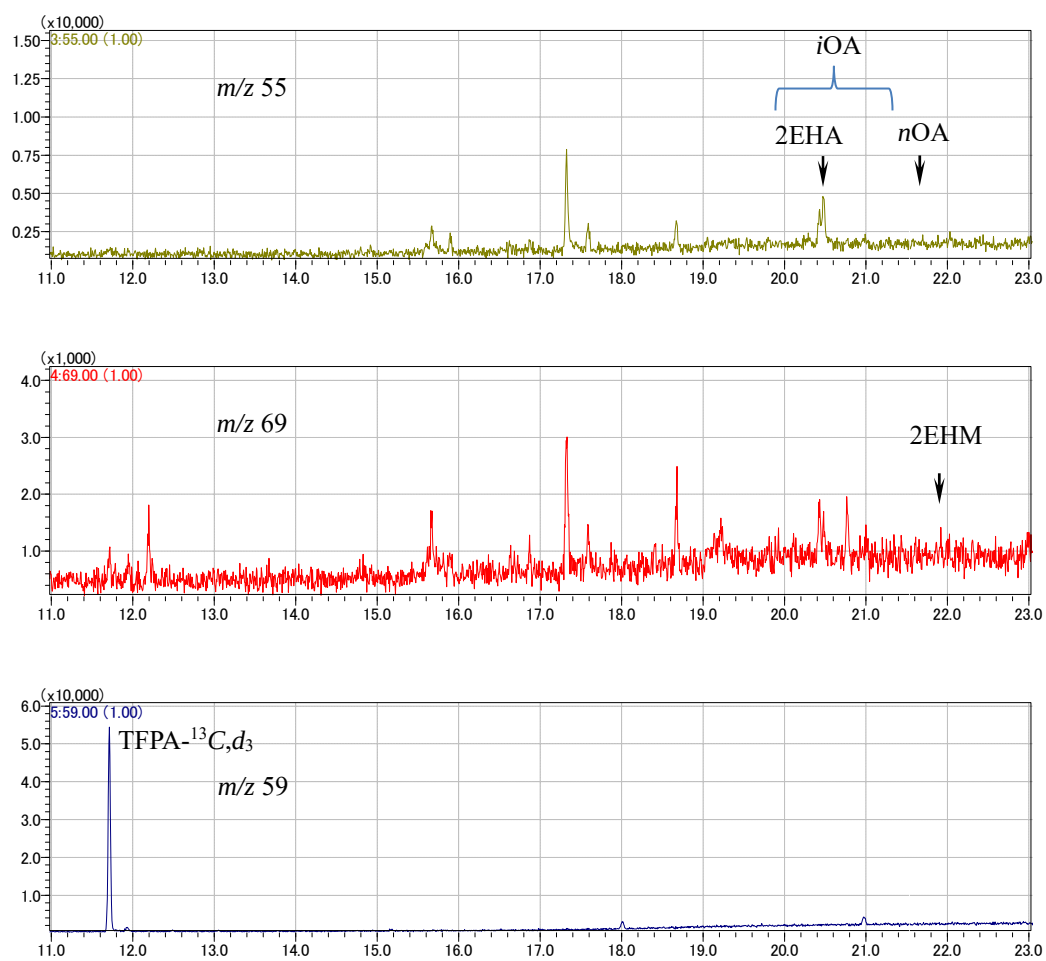


図7 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水、海水への標準物質添加回収試験結果を表 7 に、クロマトグラムを図 8-1 及び 8-2 に示す。

表 7 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	試料濃度 (µg/L)	試験 数	検出濃度 (µg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
nOA	河川水	0.010	0	2	<0.014	-	-
		0.010	0.050	7	0.041	81	9.0
	海水	0.010	0	2	<0.014	-	-
		0.010	0.50	2	0.45	90	-
iOA	河川水	0.010	0	2	<0.073	-	-
		0.010	0.20	7	0.16	80	12
	海水	0.010	0	2	<0.073	-	-
		0.010	4.0	1	3.8	95	-
2EHA	河川水	0.010	0	2	<0.015	-	-
		0.010	0.050	7	0.039	67	12
	海水	0.010	0	2	<0.015	-	-
		0.010	0.50	2	0.43	86	-
2EHM	河川水	0.010	0	2	<0.019	-	-
		0.010	0.050	7	0.035	71	14
	海水	0.010	0	2	<0.019	-	-
		0.010	0.50	2	0.42	84	-

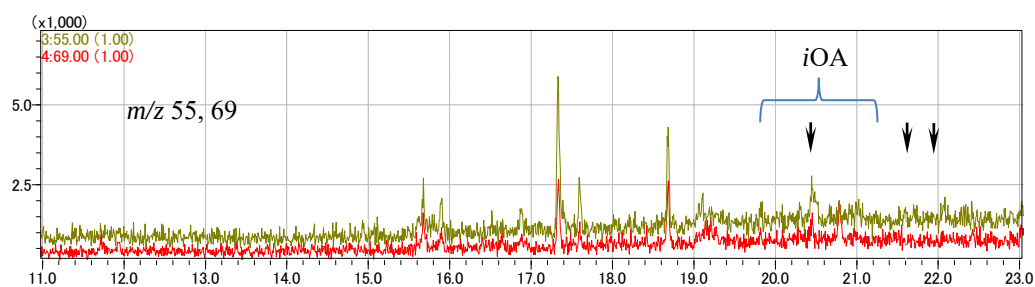


図 8-1 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（無添加試料）

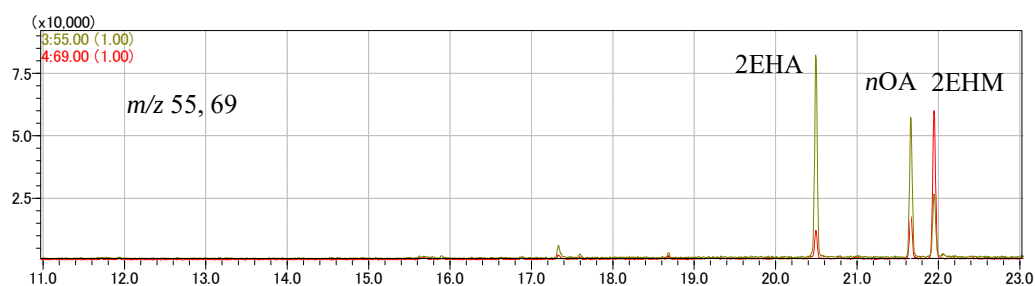


図 8-2 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（添加試料 0.50 ng/mL）

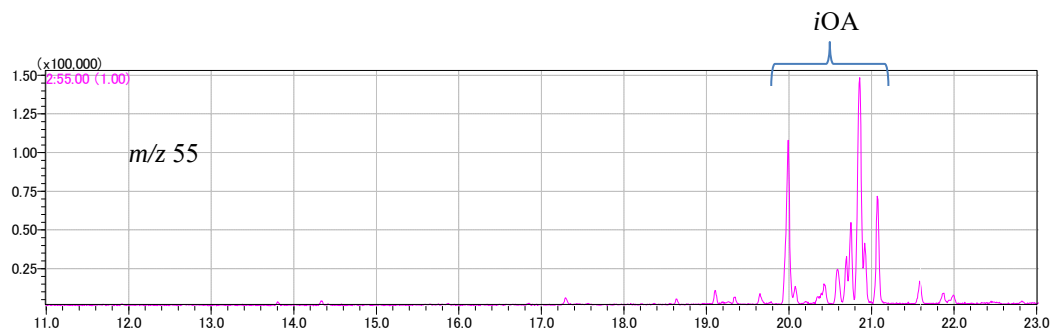


図 8-3 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（添加試料 4.0 ng/mL）

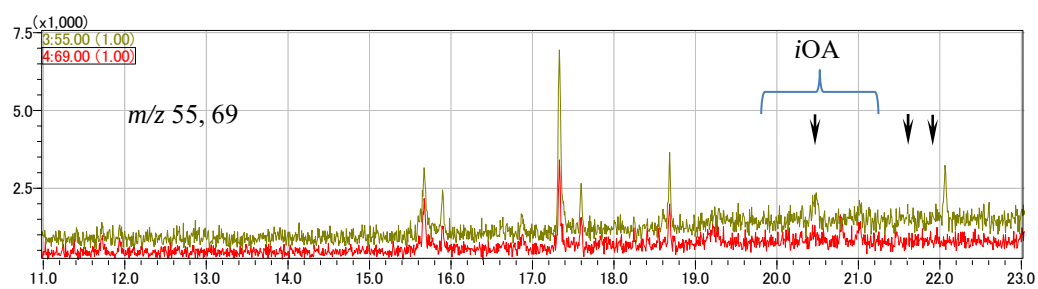


図 8-4 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム（無添加試料）

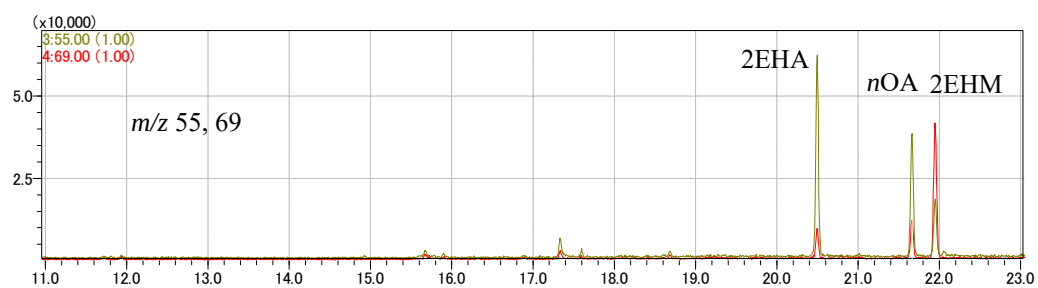


図 8-5 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム（添加試料 0.050 ng/mL）

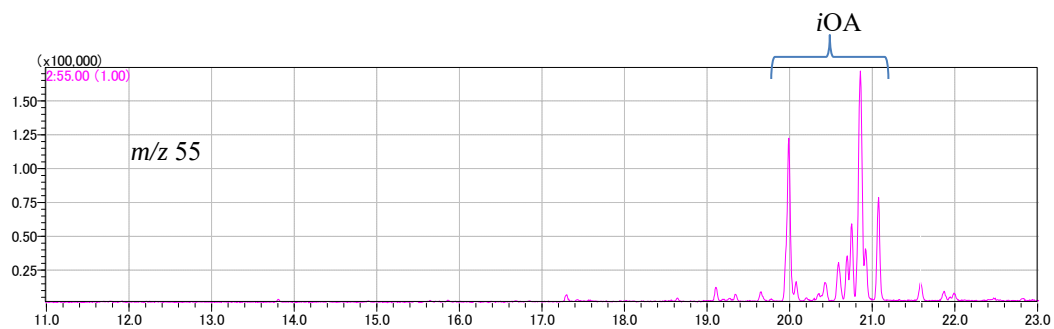


図 8-6 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム（添加試料 0.2 ng/mL）

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 8 に示す。試験の結果、*n*OA の pH 7（暗所、明所）の条件で顕著な分解性が認められた。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
				1 時間 放置後	7 日間放置後	
					暗所	明所
<i>n</i> OA	5	2	1.0	0.82 (82)	0.71 (71)	-
	7	2	1.0	0.87 (87)	0 (0)	0 (0)
	9	2	1.0	1.0 (100)	0.92 (92)	-
<i>i</i> OA	5	2	4.0	4.1 (102)	4.4 (110)	-
	7	2	4.0	4.1 (103)	4.6 (115)	4.2 (106)
	9	2	4.0	4.1 (102)	2.6 (64)	-
2EHA	5	2	1.0	0.87 (87)	0.78 (78)	-
	7	2	1.0	0.88 (88)	0.77 (77)	0.75 (75)
	9	2	1.0	1.1 (110)	1.2 (120)	-
2EHM	5	2	1.0	0.83 (83)	0.74 (74)	-
	7	2	1.0	0.84 (84)	0.88 (88)	0.80 (80)
	9	2	1.0	1.0 (100)	1.2 (120)	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 9 に示す。河川水及び海水の保存性試験は、アクリル酸エステル類を添加した各試料を 100 mL ふらん瓶に気泡が入らないように密栓し、冷暗所に保存した。保存性を高める目的で、1.0 g/L 相当のアスコルビン酸を添加した試料と比較を行った。各保存期間経過後に内標準液を添加して測定した。

7 日後の試料において、アスコルビン酸を添加しない試料は残存率の低下が認められたが、添加した試料においては、残存率は良好な結果であった。

表 9 保存性試験結果

物質名	試料	アスコルビン酸添加	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%))*		
				当日	3 日	7 日
nOA	河川水	無	1.0	0.82 (82)	0.22 (22)	0 (0)
		有	1.0	-	0.90 (90)	0.79 (79)
	海水	無	1.0	0.96 (96)	0.73 (73)	0.28 (28)
		有	1.0	-	0.96 (96)	1.1 (107)
	河川水	無	4.0	4.5 (111)	-	0.028 (1)
		有	4.0	-	-	3.8 (96)
iOA	海水	無	4.0	3.8 (95)	-	1.1 (28)
		有	4.0	-	-	4.2 (105)
	河川水	無	1.0	0.89 (89)	0.72 (72)	0.020 (2)
		有	1.0	-	0.98 (98)	0.94 (94)
	海水	無	1.0	0.98 (98)	0.94 (94)	0.93 (93)
		有	1.0	-	1.0 (105)	1.2 (119)
2EHA	河川水	無	1.0	0.82 (82)	0.87 (87)	0 (0)
		有	1.0	-	1.0 (105)	0.89 (89)
	海水	無	1.0	1.0 (105)	1.0 (100)	1.1 (108)
		有	1.0	-	1.1 (110)	1.2 (123)
	河川水	無	1.0	0.82 (82)	0.87 (87)	0 (0)
		有	1.0	-	1.0 (105)	0.89 (89)
2EHM	海水	無	1.0	1.0 (105)	1.0 (100)	1.1 (108)
		有	1.0	-	1.1 (110)	1.2 (123)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔アクリル酸イソオクチル標準品について〕

アクリル酸イソオクチル（シグマアルドリッチ製、CAS 番号 29590-42-9）の標準品を測定したところ、複数のピークが確認された。確認のため、アクリル酸オクチル（分岐鎖異性体混合物）（東京化成工業製、CAS 番号 90530-31-7）標準品を測定したところ、ほぼ同じクロマトグラムが得られた。

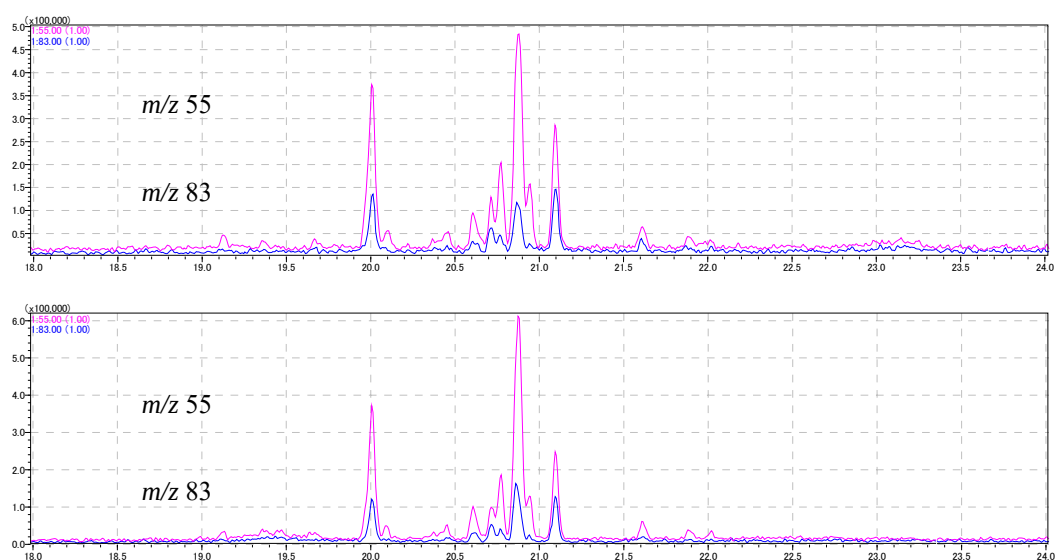


図 9-1 標準液の SIM クロマトグラム

（上図：アクリル酸イソオクチル、下図：アクリル酸オクチル（分岐鎖異性体混合物））

本分析法において、アクリル酸イソオクチルは、標準品より観測される主要なピークの内、アクリル酸 *n*-オクチルとアクリル酸 2-エチルヘキシルを除いた 5 本のピークを測定対象とした（図 9-2、矢印）。

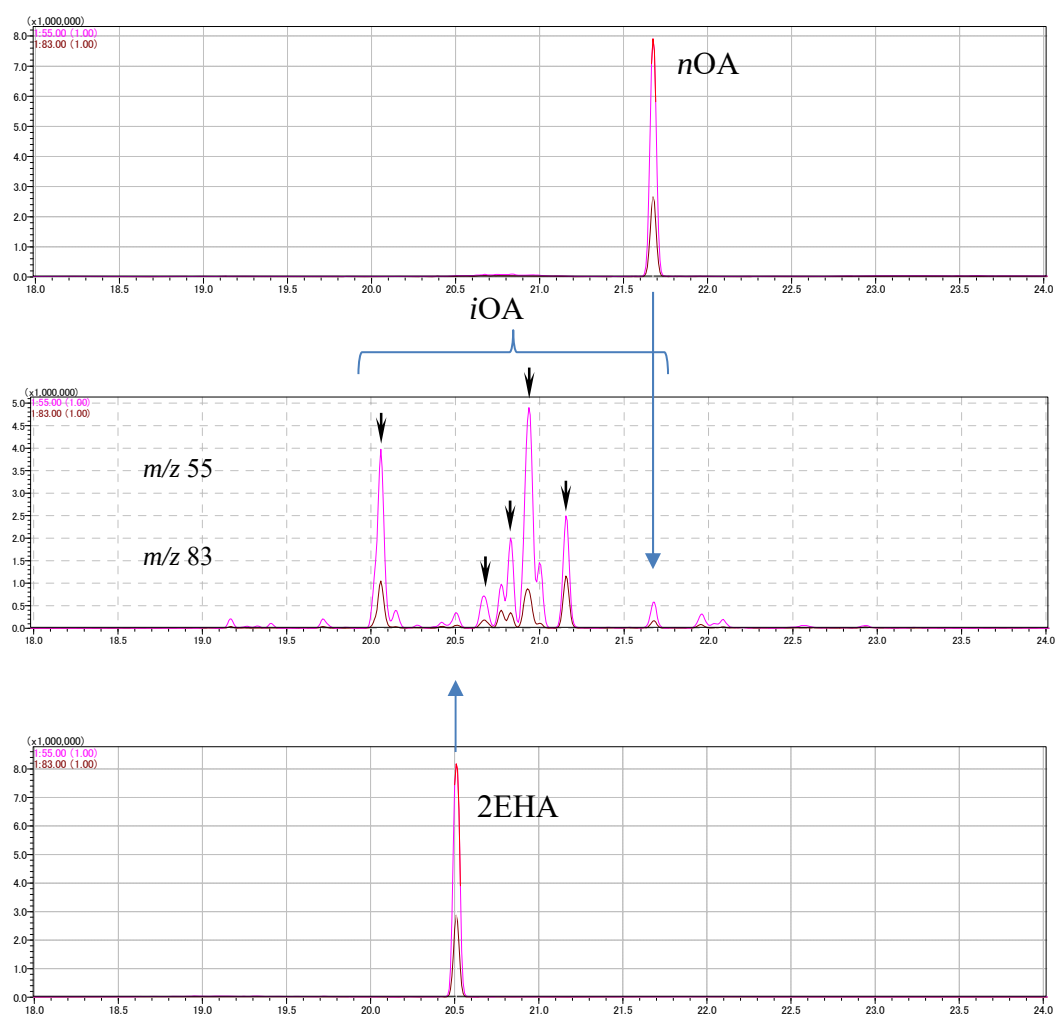


図 9-2 標準液の SIM クロマトグラム

(上図：アクリル酸 *n*-オクチル (*nOA*)、中図：アクリル酸イソオクチル (*iOA*)、下図：アクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHA))

〔アクリル酸イソオクチルの定量〕

アクリル酸イソオクチルを図 10 中のピーク①～⑤と定義した時の *nOA*、2EHA、*iOA* の面積比(As/Ais)を表 10 に、それぞれの検量線を図 11 に示す。*iOA* のピーク①～⑤を合計した検量線は、2EHA の検量線とほぼ同等であった。

本分析法においては、物質名表記に従って *iOA* の標準品としてシグマアルドリッチ製を使用した。

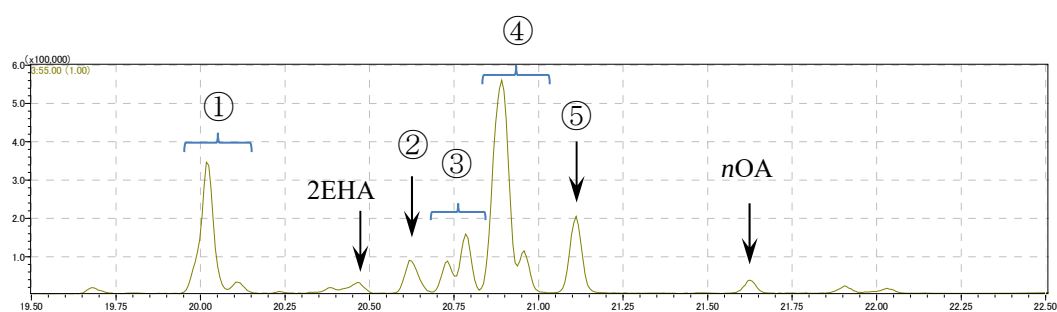


図 10 アクリル酸イソオクチルの SIM クロマトグラム

表 10 検量線作成用データ (nOA, 2EHA, iOA)

濃度 (Cs)	内標準濃 度(Cis)	濃度比 (Cs/Cis)	面積比 (As/Ais)							
			nOA	2EHA	iOA					Total ①-⑤
					①	②	③	④	⑤	
0.50	0.50	1.0	1.86	2.32	0.60	0.14	0.31	1.09	0.28	2.44
1.0	0.50	2.0	3.66	4.56	1.12	0.26	0.56	2.09	0.53	4.56
2.0	0.50	4.0	7.21	8.57	2.19	0.50	1.06	4.17	1.02	8.94
5.0	0.50	10	19.7	22.2	5.24	1.19	2.56	10.1	2.48	21.6

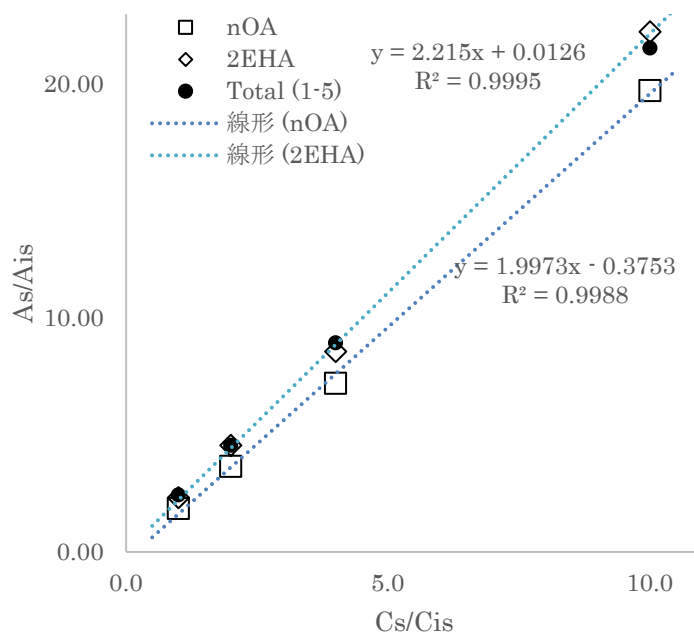


図 11 nOA、2EHA 及び iOA の検量線 (濃度範囲 : 0.50 ~ 5.0 ng/mL)

〔添加メタノールの影響〕

試料に添加するメタノール量が、定量値に与える影響について調べるために、検量線混合標準液 (0.50 ng/mL) にメタノールを 0.020～0.20 mL 添加し、定量操作を行った。結果を表 11 に示す。添加するメタノール量が増加すると、定量値が低下する傾向が認められたが、その範囲は 88～110%であった。

表 11 メタノール添加量と検量線混合標準液(0.50 ng/mL)の定量値

MeOH (mL)	<i>n</i> OA (ng/mL)	2EHA (ng/mL)	2EHM (ng/mL)
0.020	0.501	0.536	0.532
0.050	0.529	0.540	0.552
0.10	0.492	0.496	0.514
0.20	0.442	0.488	0.502

〔環境試料の分析〕

本法により、福岡県内の海水及び河川水の分析を行った結果、アクリル酸エステル類 (*n*OA, *i*OA, 2EHA)及びメタクリル酸 2-エチルヘキシルは検出されなかった。クロマトグラムを図 8-1 及び図 8-4 に示す。

【評価】

環境水中のアクリル酸エステル類 (*n*OA, *i*OA, 2EHA)及びメタクリル酸 2-エチルヘキシルの定量分析法を開発した。本法の MDL は 0.014～0.073 µg/L、MQL は 0.037～0.19 µg/L であり、操作ブランクは不検出であった。

河川水を用いた添加回収試験における回収率は、67～81% (変動係数 9.0～14%) であった。また、海水を用いた添加回収試験における回収率は、84～95%であった。

本法により、福岡県内の河川水及び海水を測定したところ、アクリル酸エステル類およびメタクリル酸 2-エチルヘキシルは検出されなかった。

以上の結果から、本法は環境水中に含まれる 0.02～0.03 µg/L オーダーのアクリル酸エステル類 (*n*OA, *i*OA, 2EHA)およびメタクリル酸 2-エチルヘキシルの検出に適用可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) 化学物質と環境 平成 24 年度化学物質分析法開発調査報告書（アクリル酸
n-ブチル他）、環境省(2013)
- 2) 化学物質と環境 平成 30 年度化学物質分析法開発調査報告書（アクリル酸
メチル他）、環境省(2019)

【担当者連絡先】

所属先名称：福岡県保健環境研究所

所属先住所：〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野 39

TEL：092-921-9946、FAX：092-928-1203

担当者名：飛石和大

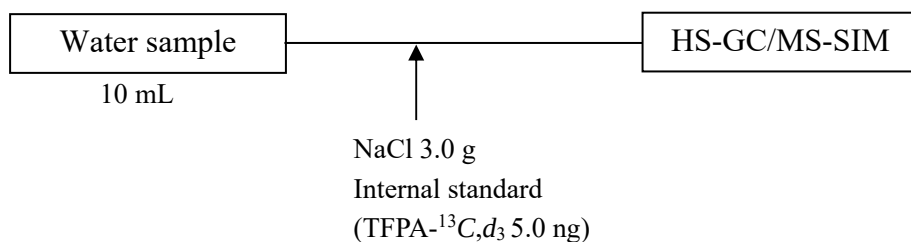
E-mail：tobiishi@fihes.pref.fukuoka.jp

***n*-Octyl acrylate,
Isooctyl acrylate,
2-Ethylhexyl acrylate,
2-Ethylhexyl methacrylate**

This method provides procedures for the determination of *n*-octyl acrylate, isooctyl acrylate, 2-ethylhexyl acrylate and 2-ethylhexyl methacrylate in water samples by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry equipped with a head-space auto sampler (HS-GC/MS).

The analytes are determined in the selected-ion-monitoring mode. The method detection limit (MDL) and the quantification limit (MQL) are 0.014 - 0.073 µg/L and 0.037 - 0.19 µg/L, respectively. The average recovery (n=7) from river water samples was 67 - 81 %, and the relative standard deviation was 9.0 - 14%. The average recovery from seawater samples was 84 - 95%.

Using this method, *n*-octyl acrylate, isooctyl acrylate, 2-ethylhexyl acrylate and 2-ethylhexyl methacrylate were not detected in seawater and river water in Fukuoka.



物質名	分析法フローチャート	備考
[1]アクリル酸オクチル (nOA) [2]アクリル酸イソオクチル (iOA) [3]アクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHA) [4]メタクリル酸 2-エチルヘキシル (2EHM)	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 10 mL] -- "塩化ナトリウム 3 g (海水試料の場合 2.7 g) 内標準物質添加 (TFPA-¹³C,d₃ 5.0 ng)" --> B[ヘッドスペース- GC/MS-SIM] </pre>	分析原理： ヘッドスペース GC/MS-SIM 検出下限値： 【水質】 (μg/L) [1] 0.014 [2] 0.073 [3] 0.015 [4] 0.019 分析条件： 機器 GC/MS： 島津製作所製 GCMS-TQ8030 カラム： Restek 製 Rtx-624 (60 m × 0.25 mm, 1.4 μm)

1-[2-(アリルオキシ)-2-(2,4-ジクロロフェニル)

エチル]-1*H*-イミダゾール

1-[2-(Allyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazole

別名：イマザリル、Imazalil

2-(1,3-チアゾール-4-イル)-1*H*-ベンゾイミダゾール

2-(1,3-Thiazol-4-yl)-1*H*-benzoimidazole

別名：チアベンダゾール、Thiabendazole

4-(2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-イル)-

1*H*-ピロール-3-カルボニトリル

4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1*H*-pyrrole-3-carbonitrile

別名：フルジオキシニル、Fludioxonil

メチル=(*E*)-2-(2-{[6-(2-シアノフェノキシ)ピリミジン-4-イル]オキシ}フェニル)-3-メトキシアクリラート

Methyl=(*E*)-2-(2-{[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxy}phenyl)-3-methoxyacrylate

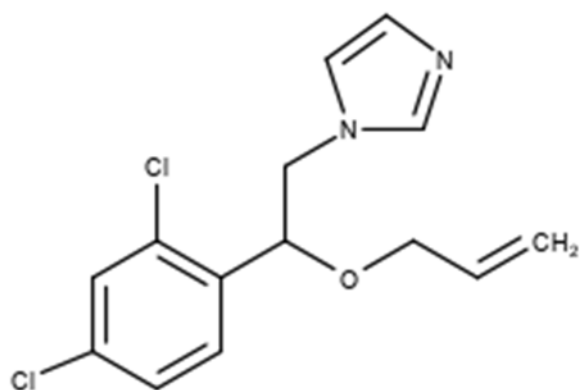
別名：アゾキシストロビン、Azoxystrobin

4,6-ジメチル-*N*-フェニルピリミジン-2-アミン

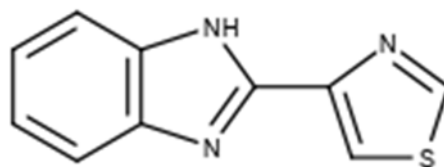
4,6-Dimethyl-*N*-phenylpyrimidin-2-amine

別名：ピリメタニル、Pyrimethanil

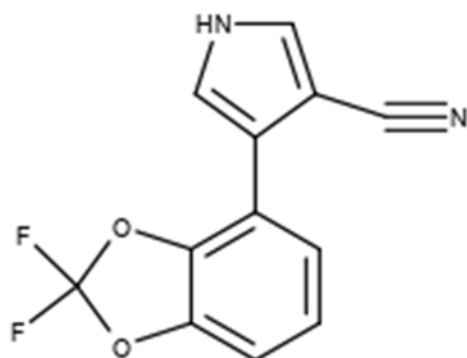
【対象物質の構造】



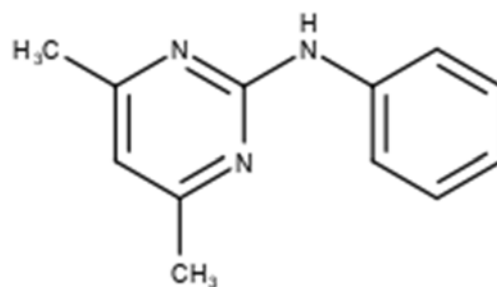
イマザリル (IMZ)
CAS 番号 : 35554-44-0
分子式 : $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$



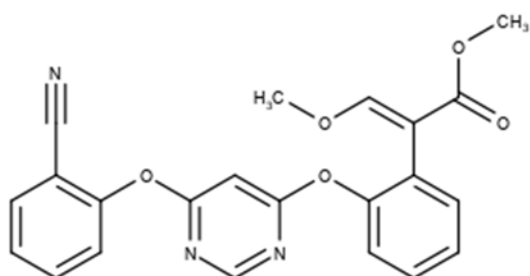
チアベンダゾール (TBZ)
CAS 番号 : 148-79-8
分子式 : $C_{10}H_7N_3S$



フルジオキシニル (FLD)
CAS 番号 : 131341-86-1
分子式 : $C_{12}H_6F_2N_2O_2$



ピリメタニル (Py)
CAS 番号 : 53112-28-0
分子式 : $C_{12}H_{13}N_3$



アゾキシストロビン (Az)
CAS 番号 : 131860-33-8
分子式 : $C_{22}H_{17}N_3O_5$

【物理化学的性状】

項目	イマザリル	チアベンダゾール	フルジオキシニル	アゾキシストロビン	ピリメタニル
分子量	297.18 ¹⁾	201.25 ¹⁾	248.19 ¹⁾	403.4 ⁵⁾	199.26 ³⁾
モノアイソトピック質量	296.0483 ¹⁾	201.0361	248.0397	403.1168	199.1109
沸点	319～347°C (推定値) ²⁾	443.05°C (推定値) ¹⁾	306°C で分解 のため測定不能 ⁴⁾	345°C で分解 のため測定不能 ⁴⁾	-
融点	50°C ²⁾	304-305°C (室温) ³⁾	199°C ³⁾	118～119°C ³⁾	96.3°C ³⁾
比重	1.2 ¹⁾	1.23 (22°C) ¹⁾	-	-	-
水溶解度	0.14 g/100 mL (20°C) ¹⁾	10000 µg/mL (25°C) ³⁾	1.8 µg/mL (25°C) ³⁾	10 µg/mL (25°C) ³⁾	121 µg/mL (25°C) ³⁾
蒸気圧	ほとんどない (20°C) ¹⁾	0.00053 mPa (25°C) ¹⁾	3.9×10 ⁻³ mPa (25°C) ³⁾	1.1×10 ⁻¹⁰ Pa (20°C) ⁴⁾	2.2×10 ⁻³ Pa (25°C) ³⁾
引火点	192°C ¹⁾	-	-	1.33 g/cm ³ ¹⁾	-
log P _{ow}	4.56 ¹⁾	2.47 ⁶⁾	4.12 ³⁾	2.64 ¹⁾	2.84 ³⁾

【毒性、用途】

[実験動物に対する急性毒性情報]¹⁾

物質名	経口：LD ₅₀
イマザリル	ラット（雄）：343 mg/kg、（雌）：227 mg/kg
チアベンダゾール	マウス：1,300 mg/kg、ラット：2,080 mg/kg
フルジオキシニル	マウス：6,280 mg/kg
アゾキシストロビン	ラット：5,000 mg/kg
ピリメタニル	マウス：4,670 mg/kg、ラット：4,150 mg/kg

[用途] ¹⁾

物質名	
イマザリル	殺菌剤、食品添加物（防カビ剤）
チアベンダゾール	食品添加物（柑橘類の防カビ剤）、 駆虫剤（動物用）、殺菌剤（失効農薬）
フルジオキシニル	農薬（殺菌剤）
アゾキシストロビン	農薬（殺菌剤）
ピリメタニル	殺菌剤（失効農薬）

出典

- 1) 独立行政法人製品評価技術基盤機構 HP「化学物質総合情報提供システム (CHRIP)」
- 2) 国際化学物質安全性カード (NIHS)
- 3) 「農薬データブック」ソフトサイエンス社（1997 年）
- 4) 「農薬評価書」食品安全委員会（2006 年 12 月）
- 5) 「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料」環境省
- 6) Nielsen LS et al; *Acta Pharm Nord* 4: 43-9 (1992)

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準を添加し、固相カートリッジに通水後、精製水で洗浄する。遠心分離とガス吹き付けにより水分を除去した後、アセトニトリルで溶出し、濃縮後、メタノールに転溶し、LC/MS/MS-SRM (IMZ、TBZ、Az、Py は ESI-positive、FLD は ESI-negative) で測定する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

イマザリル標準品	: 富士フイルム和光純薬製（残留農薬試験用）
チアベンダゾール標準品	: 富士フイルム和光純薬製（残留農薬試験用）
フルジオキシニル標準物質	: 富士フイルム和光純薬製（標準物質）、 純度 99.9%

アゾキシストロビン標準品	: 富士フイルム和光純薬製（残留農薬試験用標準物質）、純度 99.8%
ピリメタニル標準品	: 富士フイルム和光純薬製（残留農薬試験用）
PL 農薬サロゲート混合標準溶液 III（5 種類混合、ポジティブモード）	: 林純薬工業製、イマザリル- d_5 及びチアベンダゾール- $^{13}C_6$ 各 20 $\mu\text{g/mL}$ （アセトニトリル溶液）
メタノール	: 富士フイルム和光純薬製（LC/MS 用）
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬製（LC/MS 用）
酢酸アンモニウム	: 富士フイルム和光純薬製（LC/MS 用）
精製水	: 超純水製造装置 Milli-Q Reference (MERCK MILLIPORE 製) により精製
固相カートリッジ	: GL サイエンス製 InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)

【標準液の調製】

〔標準原液〕

各標準品 10.0 mg を正確に量り取り、メタノール 10 mL に溶解し、1000 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液をそれぞれ調製する。

〔サロゲート内標準液〕

イマザリル- d_5 及びチアベンダゾール- $^{13}C_6$ 混合標準溶液（20 $\mu\text{g/mL}$ 、アセトニトリル溶液）をサロゲート標準原液とし、メタノールで希釈して 1.0 $\mu\text{g/mL}$ のサロゲート内標準液を調製する。

〔検量線用混合標準液〕

各標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.10 ng/mL～100 ng/mL の検量線用混合標準液を調製する。各濃度の検量線用混合標準液には、サロゲート内標準としてイマザリル- d_5 、チアベンダゾール- $^{13}C_6$ をそれぞれ 50 ng/mL になるように添加する。

【器具】（注 1）

メスフラスコ、メスピペット、マイクロピペット、10 mL 共栓目盛付きスピッツ管、100 mL ビーカー、固相抽出器（FURUE Science 製 ローラーポンプ）、遠心分離器（Portable Centerifuge NT-4）、窒素吹付装置、LC 用バイアル

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）の「試料の採取及び検体の調製等」に従って採取する。採水容器（プラスチック製、ガラス製いずれでも可）に満水になるよう採取し、速やかに試験操作を行う。直ちに分析できない場合は、冷蔵保存し、7 日以内に分析を行う。

【試料の前処理及び試験液の調製】

試料100 mLにサロゲート内標準液（1.0 µg/mL、メタノール溶液）を250 µL添加し、十分に混和した後、固相カートリッジ（注2）に10 mL/min程度で通水する。通水後、固相カートリッジを精製水10 mLで洗浄し（海水の場合は精製水60 mLで洗浄する）、15分間程度窒素ガスを通気し、固相中の水分を除去する。その後、アセトニトリル6 mLを用いて溶出する。溶出液は40°C 以下で窒素ガス気流下で0.1 mL程度にまで濃縮した後、メタノールで5 mLに定容したものを試験液とする。

【空試験液の調製】

試料水と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 測定条件〕（注 3）

〔LC 条件〕

使用機種	: Waters 製 ACQUITY UPLC
カラム	: Waters 製 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 µm)
移動相	: A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール
	0 → 2 min A: 90 → 20, B: 10 → 80 linear gradient
	2 → 3 min A: 20 → 10, B: 80 → 90 linear gradient
	3 → 6 min A: B = 10: 90
	6 → 6.1 min A: 10 → 5, B: 90 → 95 linear gradient
	6.1 → 11 min A: B = 5: 95
	11 → 11.5 min A: 5 → 90, B: 95 → 10 linear gradient
	11.5 → 15 min A: B = 90: 10

カラム流量 : 0.3 mL/min

カラム温度 : 40°C

試料注入液量 : 5.0 µL

[MS 条件]

使用機種 : Waters 製 Xevo TQ MS

イオン化法 : IMZ、TBZ、Az、Py : ESI-Positive
FLD : ESI-Negative

測定モード : SRM

キャピラリー電圧 : 3.00 kV

脱溶媒温度 : 500°C

ソース温度 : 150°C

脱溶媒ガス流量 : 650 L/Hr

[モニターイオン]

物質名		プレカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	コリジョン エネルギー (eV)
イマザリル	(定量用)	297.00	158.9	22
	(確認用)	297.00	69.01	18
チアベンダ ゾール	(定量用)	202.03	131.04	32
	(確認用)	202.03	174.99	26
フルジオキ ソニル	(定量用)	246.90	125.9	32
	(確認用)	246.90	179.9	30
アゾキシス トロビン	(定量用)	404.10	344.12	26
	(確認用)	404.10	372.08	16
ピリメタニ ル	(定量用)	200.03	106.98	24
	(確認用)	200.03	82.04	26
イマザリル - <i>d</i> ₅	(定量用)	302.00	158.89	24
	(確認用)	302.00	68.94	18
チアベンダ ゾール- ¹³ C ₆	(定量用)	207.93	137.01	32
	(確認用)	207.93	181.02	26

〔検量線〕

各検量線用混合標準液 5.0 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から相対検量線を作成する。

イマザリル、チアベンダゾール以外の物質については、対象物質の濃度と得られたピーク面積から絶対検量線を作成する（注 4）。

〔定量〕

試験液 5.0 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート物質の濃度及びピーク面積比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

〔イマザリル、チアベンダゾール：サロゲート法〕

試料中の濃度 C (ng/L) は、次式により算出する。

$$C \text{ (ng/L)} = R \cdot Q/V$$

R ：検量線から求めたサロゲート内標準物質に対する対象物質の濃度比

Q ：試料中に添加したサロゲート内標準物質の量 (ng)

（添加するサロゲート内標準液の濃度 (µg/µL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (µL) × 1000）

V ：試料量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 250 \text{ (ng)}$$

（添加するサロゲート内標準液の濃度 (0.0010 µg/µL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (250 µL) × 1000）

$$V = 0.1 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 2500 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔アゾキシストロビン、フルジオキサニル、ピリメタニル：絶対検量線法〕

水質試料中の濃度は、次式により算出する。

$$\text{水質試料中の濃度 (ng/L)} = \text{検出濃度 (ng/mL)} \times \text{最終液量 (mL)} / \text{試料量 (L)}$$

〔サロゲート回収率の算出〕

「検量線のサロゲート内標準のピーク強度」に対する「試料中のサロゲート内標準のピーク強度」の比から回収率を算出する。サロゲート回収率は「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って 50～120%の範囲を目安とする。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す（注 5）。

表 1 IDL の算出結果				
物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
イマザリル	0.20	0.10	5.0	0.0020
チアベンダゾール	0.26	0.10	5.0	0.0026
フルジオキシニル	0.30	0.10	5.0	0.0030
アゾキシストロビン	0.12	0.10	5.0	0.0012
ピリメタニル	0.20	0.10	5.0	0.0020

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す（注 6）。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果					
物質名	試料	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
イマザリル	河川水	0.10	5.0	0.0039	0.0099
チアベンダゾール	河川水	0.10	5.0	0.0013	0.0034
フルジオキシニル	河川水	0.10	5.0	0.0056	0.014
アゾキシストロビン	河川水	0.10	5.0	0.0024	0.0063
ピリメタニル	河川水	0.10	5.0	0.0051	0.013

注 解

- (注1) JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。マイクロピペットを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2%以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注2) 固相カートリッジは、10 mL のアセトニトリルと 10 mL の精製水で順次コンディショニングしたものを使用する。
- (注3) LC/MS/MS の測定条件は、本測定に使用した機種特有のものである。
- (注4) 検量線作成用標準液のサロゲート内標準の応答値について、対象物質の濃度が上がるにつれて、サロゲート内標準の応答値が低下する現象が発生するおそれがある。

チアベンダゾール- $^{13}\text{C}_6$ では、検量線高濃度域で応答値の著しい低下が発生することがあった。この要因として、イオン化抑制（イオン性の高い化合物が同時に大量に存在すると、片方のイオン化効率が低下する現象）が考えられた。特に、対象物質濃度 200 ng/mL 以上でサロゲート内標準の応答値の低下が著しかったことから、本分析法では検量線の最高濃度は 100 ng/mL とした。検量線作成時にサロゲート内標準の応答値の低下が見られた場合は、サロゲート内標準の応答値が同水準と見なせる範囲で検量線を作製し、試料の定量をおこなう必要がある。

(注5) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時の SRM クロマトグラムを図 1-1~1-5 に示した。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	イマザリ ル	チアベン ダゾール	フルジオ キソニル	アゾキシス トロビン	ピリメタ ニル
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
注入量 (pg)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
装置注入液量 (μL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
結果 1 (pg)	0.513	0.504	0.617	0.401	0.408
結果 2 (pg)	0.490	0.505	0.726	0.438	0.392
結果 3 (pg)	0.429	0.522	0.533	0.473	0.514
結果 4 (pg)	0.530	0.366	0.663	0.451	0.434
結果 5 (pg)	0.406	0.462	0.663	0.394	0.399
結果 6 (pg)	0.544	0.390	0.616	0.445	0.367
結果 7 (pg)	0.486	0.385	0.509	0.393	0.475
平均値 (pg)	0.4854	0.4476	0.6183	0.4279	0.4269
標準偏差(σ_{n-1}) (pg)	0.0509	0.0660	0.0763	0.0319	0.0514
IDL (pg) *	0.20	0.26	0.30	0.12	0.20
IDL 試料換算値 (ng/L)	2.0	2.6	3.0	1.2	2.0
S/N	12	15	29	23	8.7
CV (%)	11	15	12	7.5	12

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

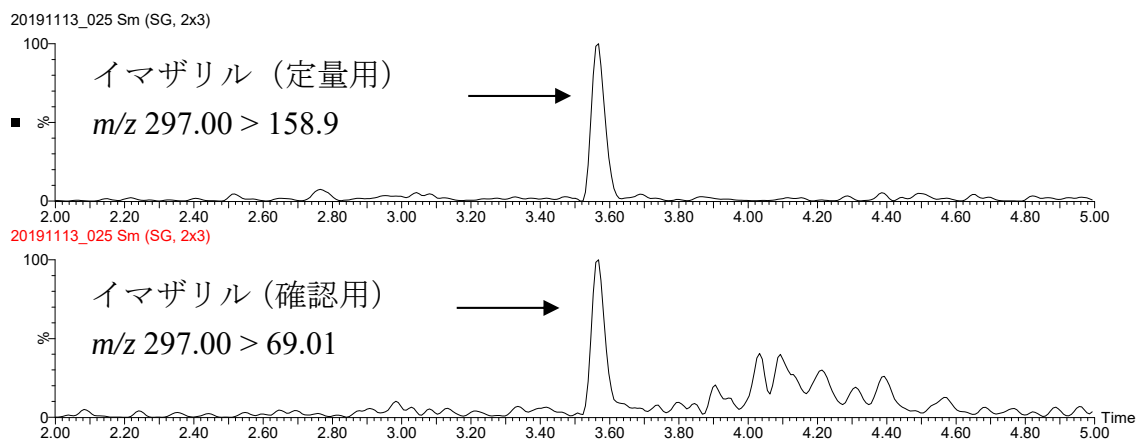


図 1-1 IDL 測定時のクロマトグラム (イマザリル)

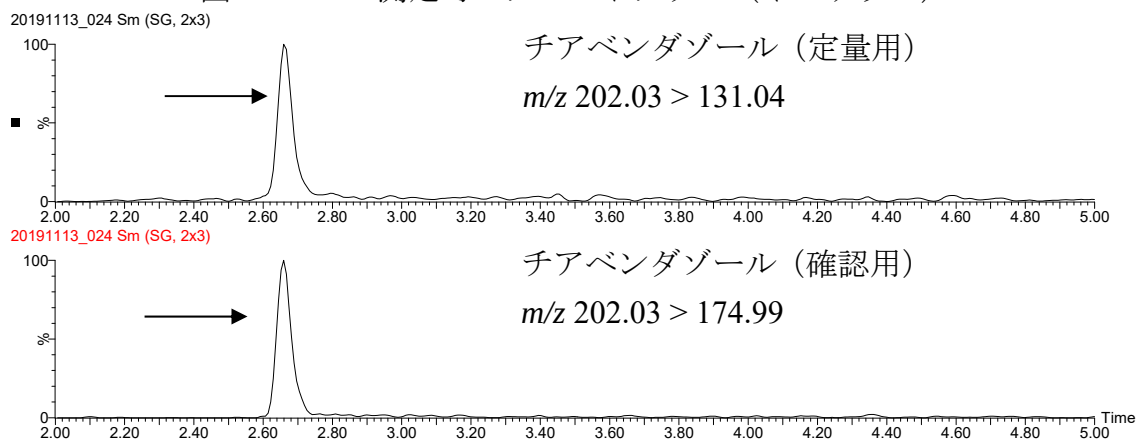


図 1-2 IDL 測定時のクロマトグラム (チアベンダゾール)

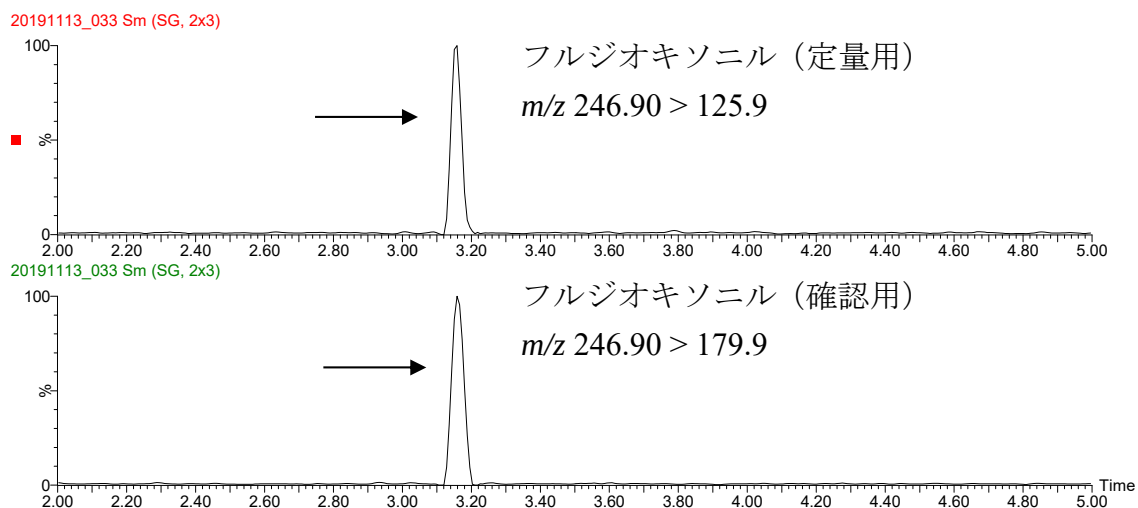


図 1-3 IDL 測定時のクロマトグラム (フルジオキシニル)

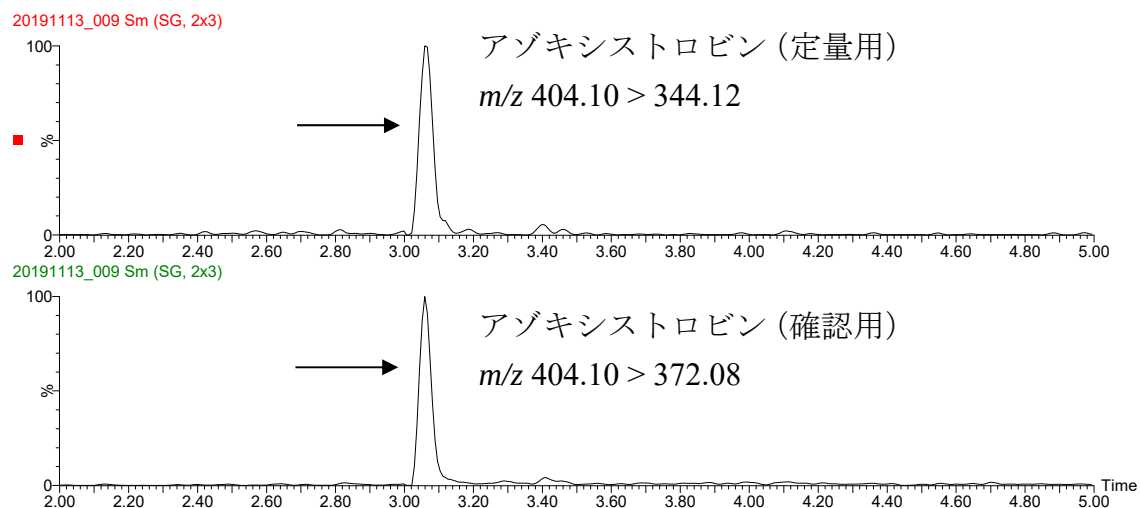


図 1-4 IDL 測定時のクロマトグラム (アゾキシストロビン)

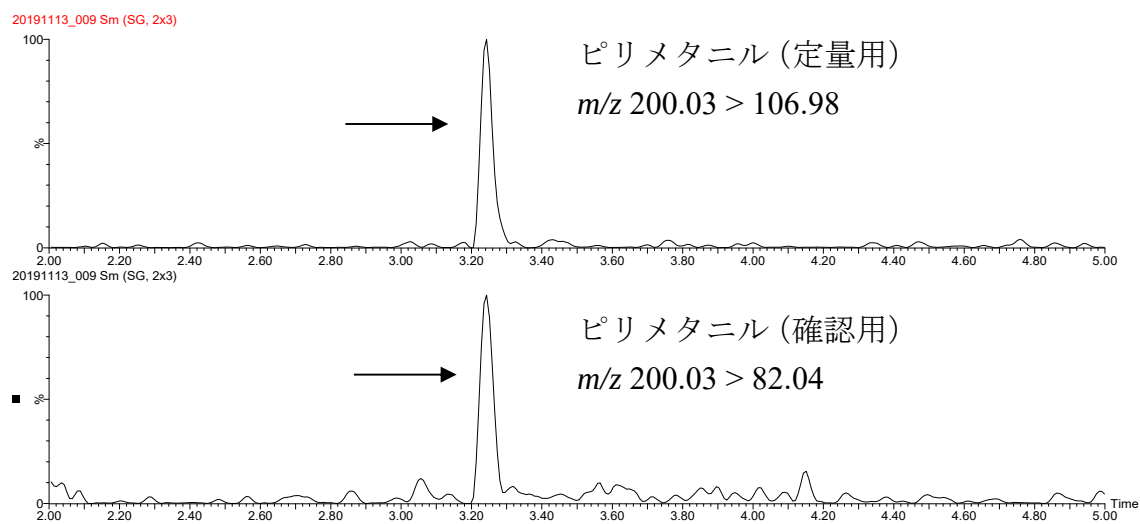


図 1-5 IDL 測定時のクロマトグラム (ピリメタニル)

(注 6) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 4-1～4-3 のとおり算出した。また、MDL 及び MQL 測定時の SRM クロマトグラムを図 2-1～2-3 に示した。

表 4-1 イマザリルの MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) *1

対象物質名	イマザリル	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)
試料	河川水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-
標準添加量 (μg)	0.0010	-	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.010	-	-
最終液量 (mL)	5.0	-	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.20	-	-
装置注入液量 (μL)	5.0	-	-
操作ブランク平均 (μg/L)*2	<0.0039	-	97
無添加平均 (μg/L)*3	<0.0039	-	104
結果 1 (μg/L)	0.0124	124	77
結果 2 (μg/L)	0.00935	93	99
結果 3 (μg/L)	0.00978	98	102
結果 4 (μg/L)	0.00990	99	107
結果 5 (μg/L)	0.00977	98	93
結果 6 (μg/L)	0.0100	100	101
結果 7 (μg/L)	0.0101	101	100
平均値 (μg/L)	0.01018	102	97.0
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.000994		
MDL (μg/L)*4	0.0039		
MQL (μg/L)*5	0.0099		
S/N 比	9.3		
CV (%)	9.8		

*1: 定量結果は、サロゲート法により補正した値。

*2: 空試験液を測定した値の平均値 (n=3)

*3: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*4: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

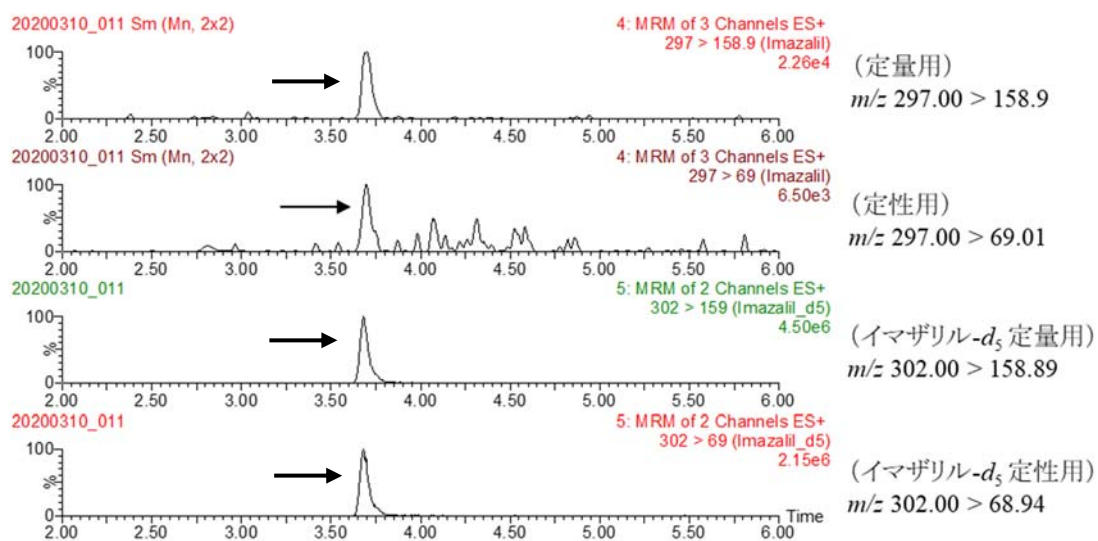


図 2-1 MDL 測定時のイマザリルのクロマトグラム
(河川水、試料換算濃度 : 0.010 ng/mL)

表 4-2 チアベンダゾールの MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) *1

対象物質名	チアベンダ ゾール	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)
試料	河川水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-
標準添加量 (μg)	0.0010	-	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.010	-	-
最終液量 (mL)	5.0	-	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.20	-	-
装置注入液量 (μL)	5.0	-	-
操作ブランク平均 (μg/L)*2	<0.0013	-	106
無添加平均 (μg/L)*3	<0.0013	-	112
結果 1 (μg/L)	0.00979	98	100
結果 2 (μg/L)	0.00990	99	117
結果 3 (μg/L)	0.0104	104	117
結果 4 (μg/L)	0.0102	102	117
結果 5 (μg/L)	0.0104	104	117
結果 6 (μg/L)	0.00952	95	115
結果 7 (μg/L)	0.0102	102	120
平均値 (μg/L)	0.01006	101	115
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.000341		
MDL (μg/L)*4	0.0013		
MQL (μg/L)*5	0.0034		
S/N 比	11		
CV (%)	3.4		

*1: 定量結果は、サロゲート法によりで補正した値である。

*2: 空試験液を測定した値の平均値 (n=3)

*3: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*4: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

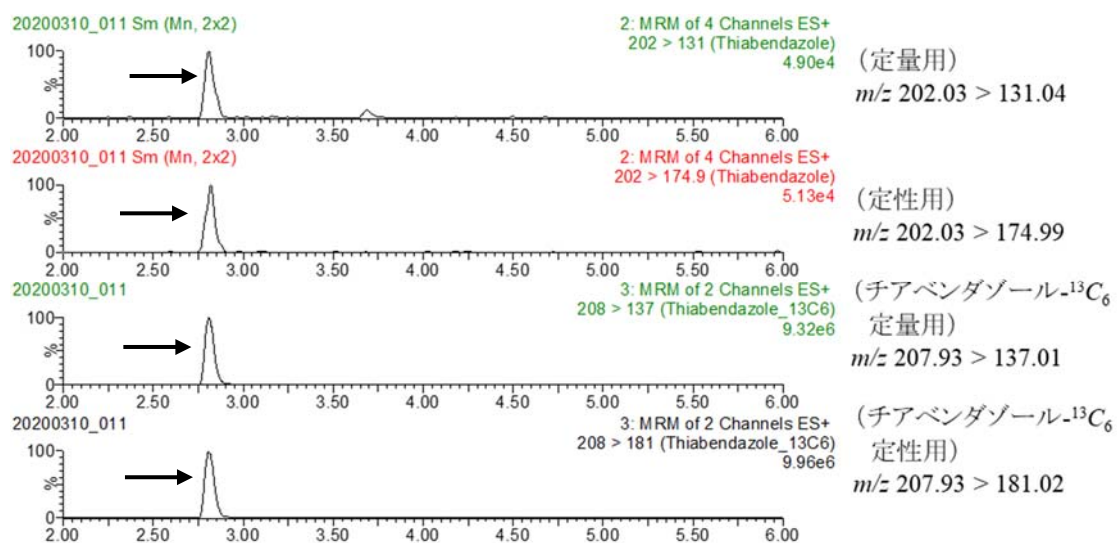


図 2-2 MDL 測定時のチアベンダゾールのクロマトグラム
(河川水、試料換算濃度 : 0.010 ng/mL)

表 4-3 フルジオキサニル、アゾキシストロビン、ピリメタニルの MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

対象物質名	フルジオキサニル	回収率(%)	アゾキシストロビン	回収率(%)	ピリメタニル	回収率(%)
試料	河川水	-	河川水	-	河川水	-
試料量 (L)	0.10	-	0.10	-	0.10	-
標準添加量 (μg)	0.0010	-	0.0010	-	0.0010	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.010	-	0.010	-	0.010	-
最終液量 (mL)	5.0	-	5.0	-	5.0	-
注入液濃度 (μg/L)	0.20	-	0.20	-	0.20	-
装置注入液量 (μL)	5.0	-	5.0	-	5.0	-
操作ブランク平均 (μg/L) * ¹	<0.0056	-	<0.0024	-	<0.0051	-
無添加平均(μg/L) * ²	<0.0056	-	<0.0024	-	<0.0051	-
結果 1 (μg/L)	0.00750	75	0.00914	91	0.0116	116
結果 2 (μg/L)	0.00773	77	0.00943	94	0.0122	122
結果 3 (μg/L)	0.00821	82	0.0103	103	0.00908	91
結果 4 (μg/L)	0.00869	87	0.0106	106	0.0109	109
結果 5 (μg/L)	0.00895	89	0.0104	104	0.0113	113
結果 6 (μg/L)	0.0113	113	0.00956	96	0.00960	96
結果 7 (μg/L)	0.0106	106	0.0107	107	0.0127	127
平均値 (μg/L)	0.008999	90.0	0.01001	100	0.01106	111
標準偏差 (μg/L)	0.00144	-	0.000626	-	0.00131	-
MDL (μg/L) * ³	0.0056	-	0.0024	-	0.0051	-
MQL (μg/L) * ⁴	0.014	-	0.0063	-	0.013	-
S/N 比	33	-	18	-	12	-
CV (%)	16	-	6.3	-	12	-

*1: 空試験液を測定した値の平均値 (n=3)

*2: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

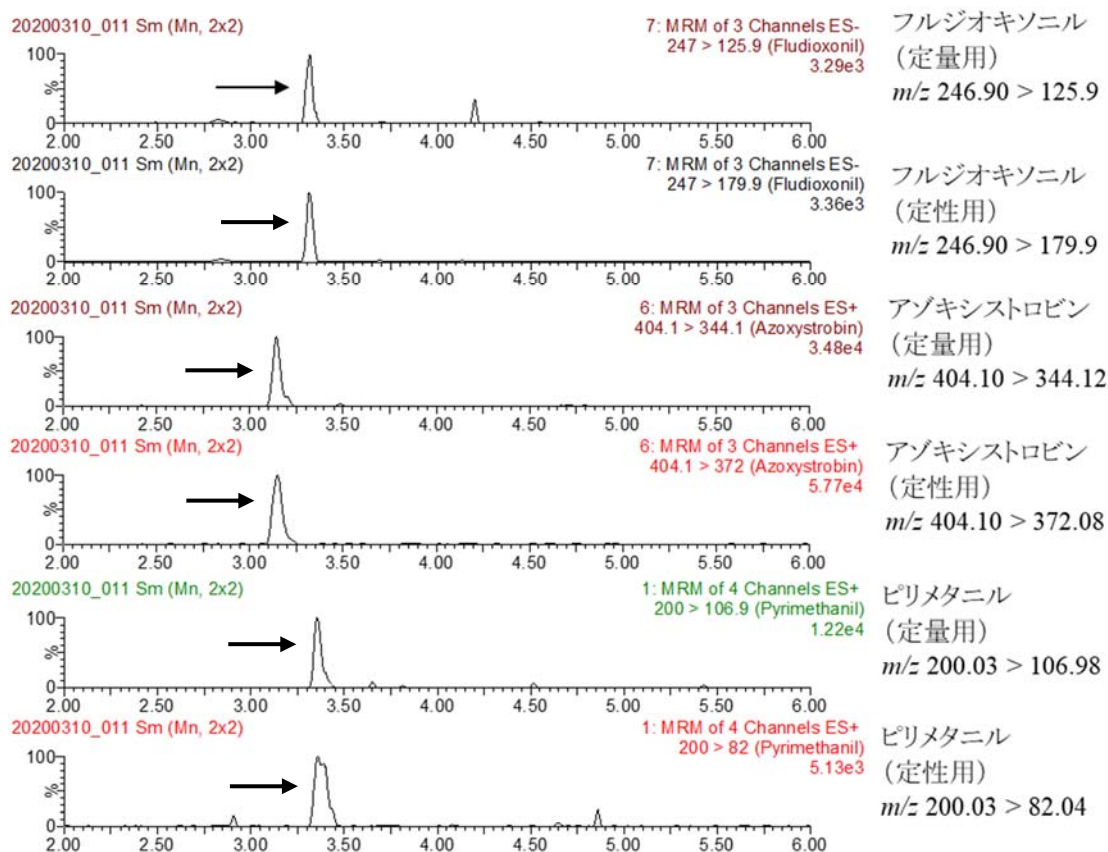


図 2-3 MDL 測定時のフルジオキシニル、アゾキシストロビン、
 ピリメタニルのクロマトグラム
 (河川水、試料換算濃度 : 0.010 $\mu\text{g/L}$)

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

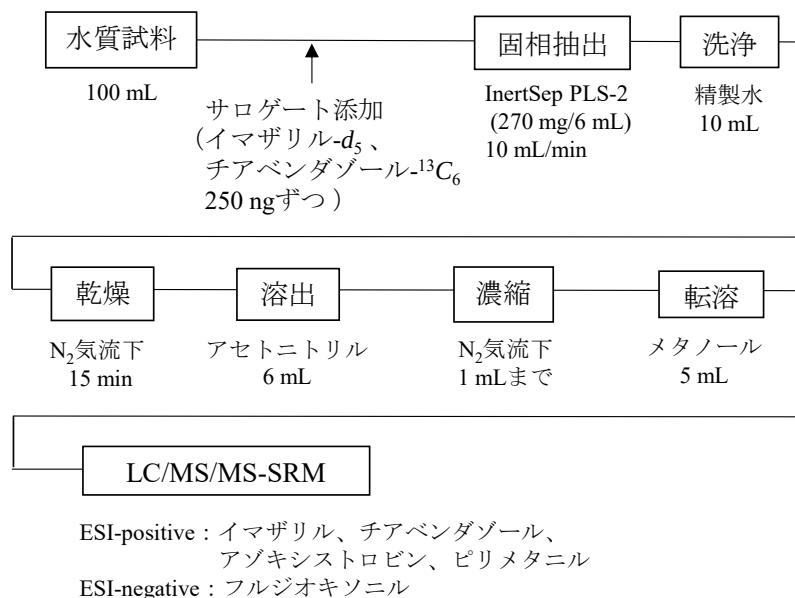


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図4-1～4-5に、検量線作成データを表5-1～5-3に示す。イマザリル、チアベンダゾールについてはサロゲート法で、それ以外については絶対検量線法とした。

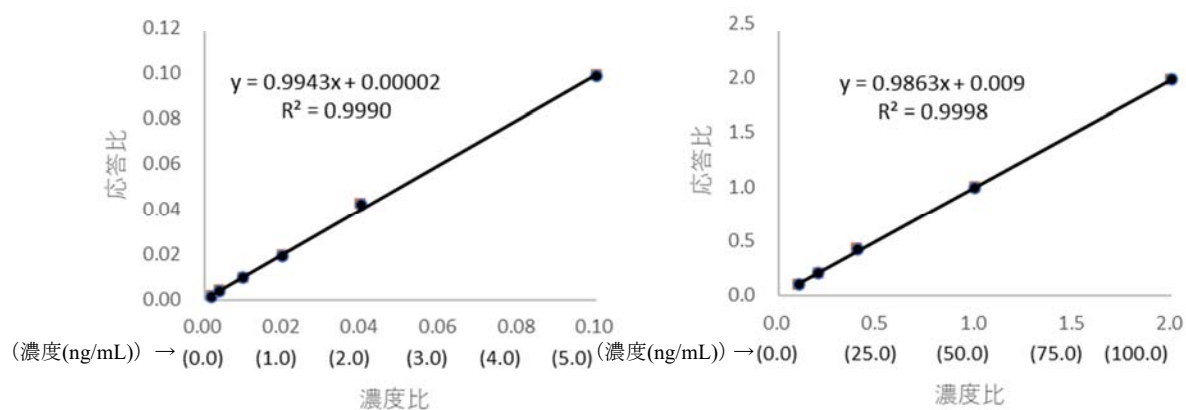


図4-1 イマザリルの検量線

左図：低濃度検量線（0.10～5.0 ng/mL、サロゲート内標準 50 ng/mL）

右図：高濃度検量線（5.0～100 ng/mL、サロゲート内標準 50 ng/mL）

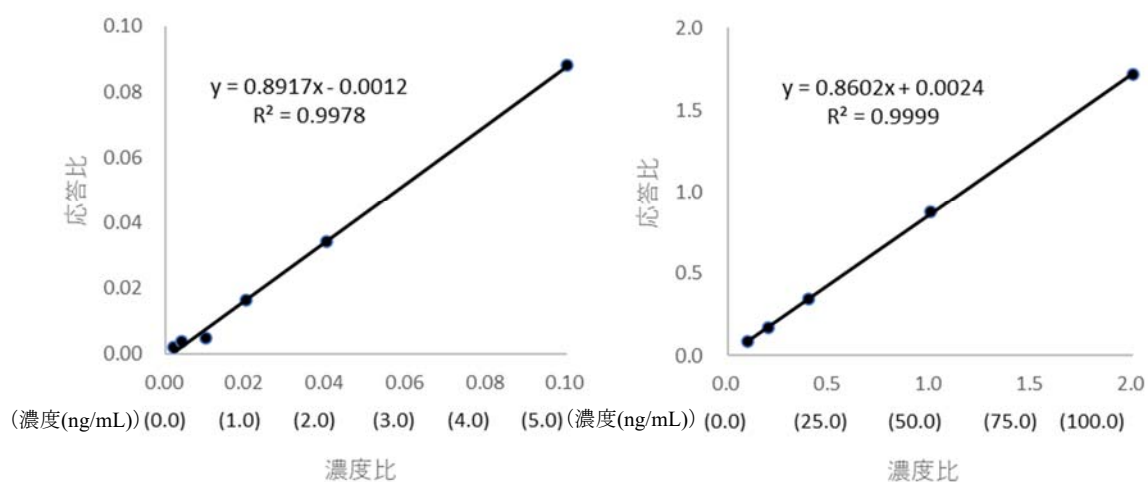


図 4-2 チアベンダゾールの検量線

左図：低濃度検量線 (0.10 ~ 5.0 ng/mL、サロゲート内標準 50 ng/mL)

右図：高濃度検量線 (5.0 ~ 100 ng/mL、サロゲート内標準 50 ng/mL)

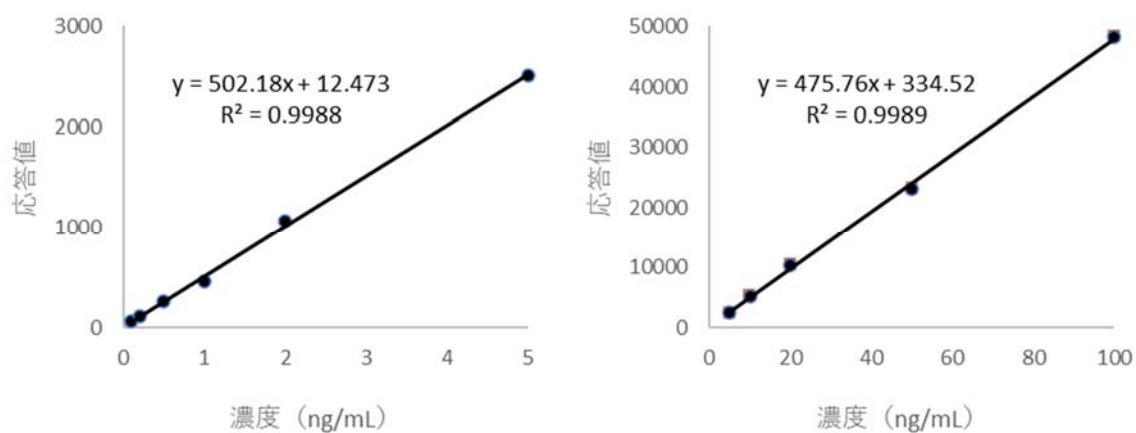


図 4-3 フルジオキシニルの検量線

左図：低濃度検量線 (0.10 ~ 5.0 ng/mL)、右図：高濃度検量線 (5.0 ~ 100 ng/mL)

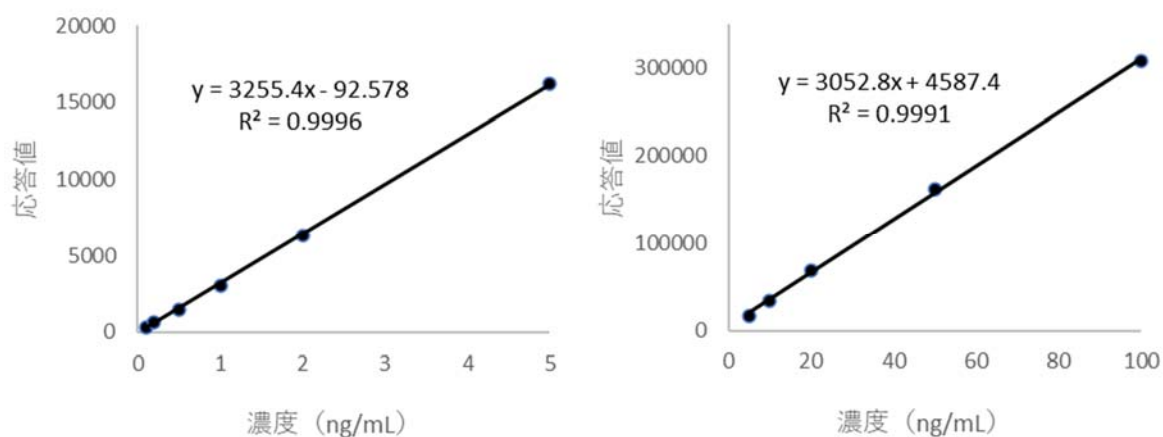


図 4-4 アゾキシストロビンの検量線

左図：低濃度検量線 (0.10 ~ 5.0 ng/mL)、右図：高濃度検量線 (5.0 ~ 100 ng/mL)

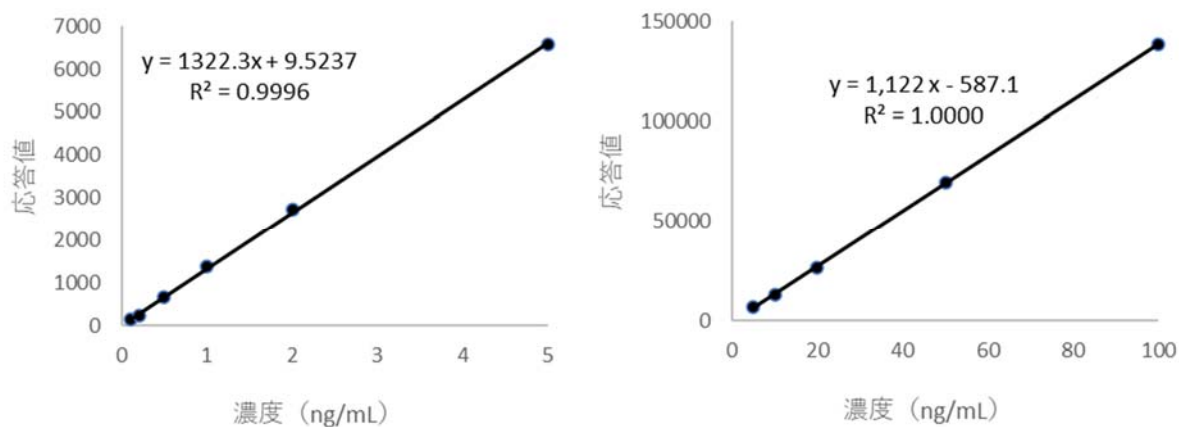


図 4-5 ピリメタニルの検量線

左図：低濃度検量線 (0.10 ~ 5.0 ng/mL)、右図：高濃度検量線 (5.0 ~ 100 ng/mL)

表 5-1 イマザリルの検量線作成用データ

標準液		応答値		
濃度 (ng/mL)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	対象物質(A _s) 【イマザリル】 (m/z 297.00 > 158.9)	内標準物質(A _{is}) 【イマザリル-d ₅ 】 (m/z 302.00 > 158.89)	応答比 (A _s /A _{is})
(C _s)				
0.10	0.002	247	168540	0.00147
0.20	0.004	676	171047	0.00395
0.50	0.01	1571	164449	0.00955
1.0	0.02	3317	171569	0.01933
2.0	0.04	6947	165043	0.0421
5.0	0.1	16458	166772	0.0987
10	0.2	33809	168888	0.200
20	0.4	68382	162373	0.421
50	1	156208	156957	0.995
100	2	292606	147845	1.98

C_{is}* : 内標準物質濃度 50 ng/mL

表 5-2 チアベンダゾールの検量線作成用データ

標準液		応答値		
濃度 (ng/mL)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	対象物質(A _s) 【チアベンダゾール】 (m/z 202.03 > 131.04)	内標準物質(A _{is}) 【チアベンダゾール- ¹³ C ₆ 】 (m/z 207.93 > 137.01)	応答比 (A _s /A _{is})
(C _s)				
0.10	0.002	731	353269	0.00207
0.20	0.004	1306	349259	0.00374
0.50	0.01	1801	364903	0.00494
1.0	0.02	6127	371470	0.0165
2.0	0.04	12833	374451	0.0343
5.0	0.1	31183	353196	0.0883
10	0.2	62910	369852	0.170
20	0.4	124939	364862	0.342
50	1	285630	325771	0.877
100	2	522234	304192	1.72

C_{is}* : 内標準物質濃度 50 ng/mL

表 5-3 フルジオキシソニル、アゾキシストロビン、
ピリメタニルの検量線作成用データ

標準液 濃度 (ng/mL)	面積		
	フルジオキシソニル (m/z 246.90 > 125.9)	アゾキシストロビン (m/z 404.10 > 344.12)	ピリメタニル (m/z 200.03 > 106.98)
0.10	63	341	133
0.20	120	682	216
0.50	266	1480	654
1.0	464	2996	1378
2.0	1066	6344	2721
5.0	2512	16245	6588
10	5321	34051	13075
20	10430	67966	26418
50	23161	162279	69789
100	48261	307165	138294

[クロマトグラム]

標準液の SRM クロマトグラムを図 5-1～5-7 に示す。

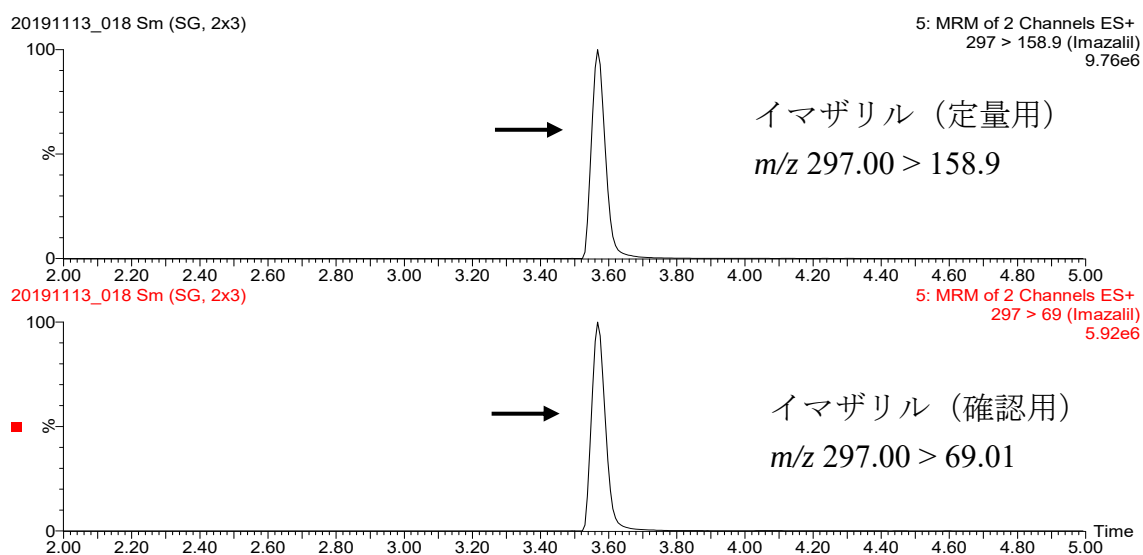


図 5-1 標準液のクロマトグラム (イマザリル : 100 ng/mL)

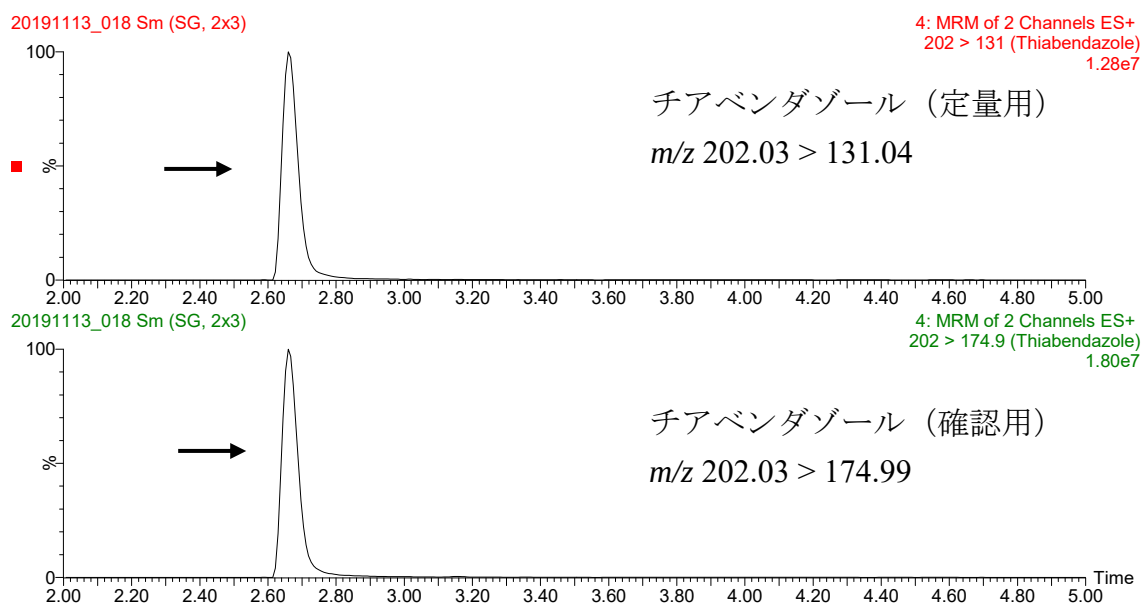


図 5-2 標準液のクロマトグラム (チアベンダゾール : 100 ng/mL)

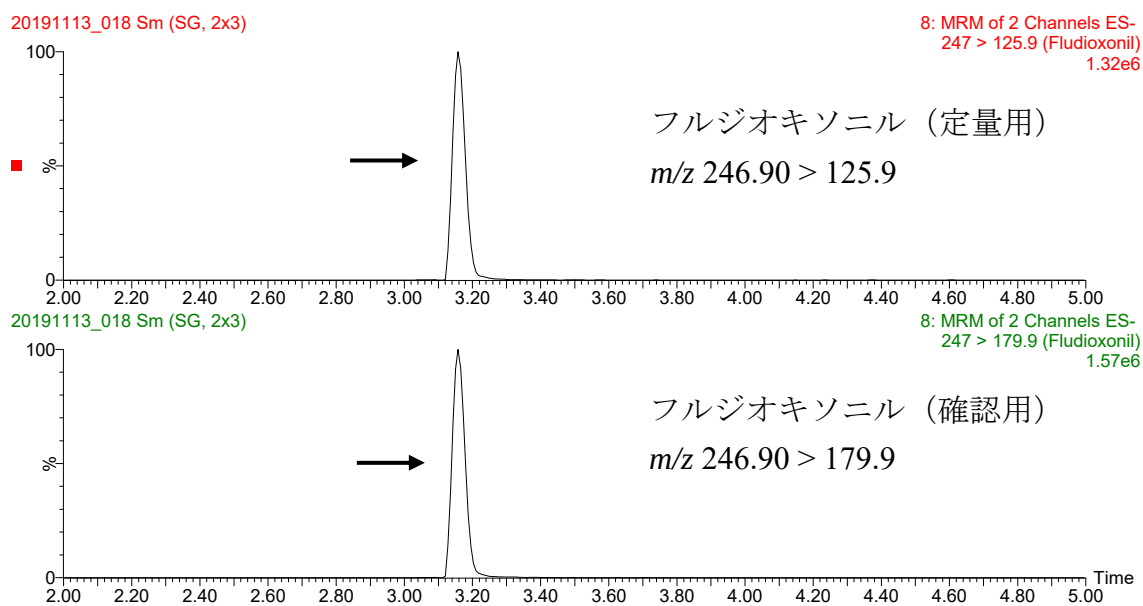


図 5-3 標準液のクロマトグラム (フルジオキシニル : 100 ng/mL)

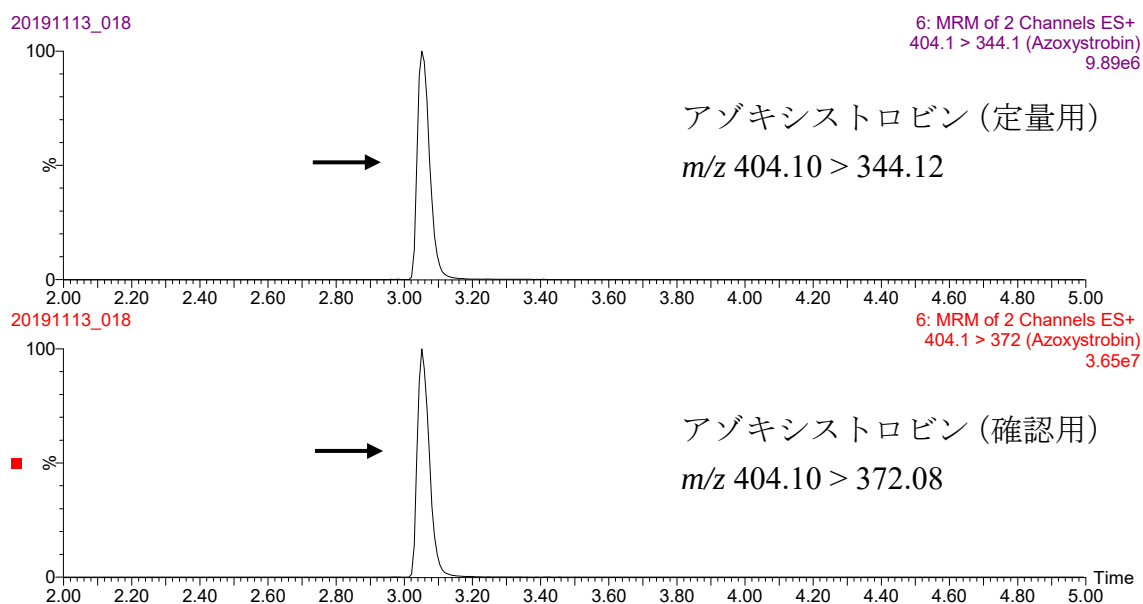


図 5-4 標準液のクロマトグラム (アゾキシストロビン : 100 ng/mL)

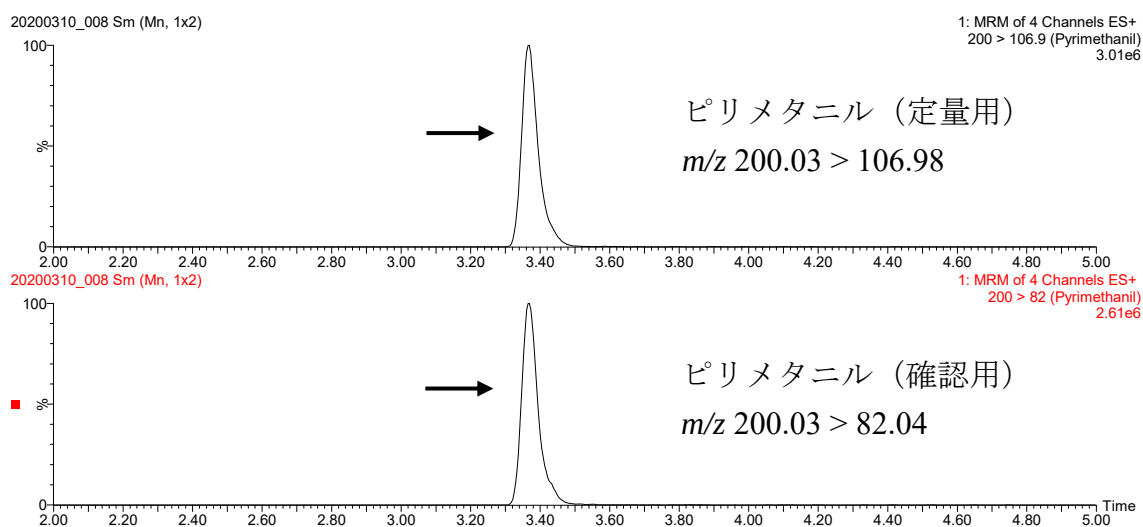


図 5-5 標準液のクロマトグラム (ピリメタニル : 100 ng/mL)

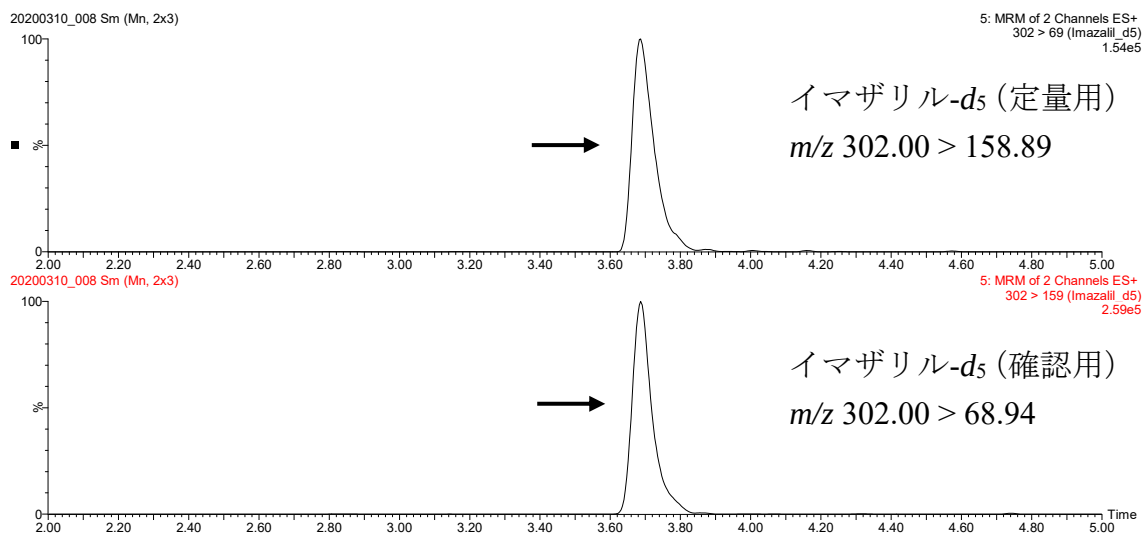


図 5-6 標準液のクロマトグラム (イマザリル- d_5 : 10 ng/mL)

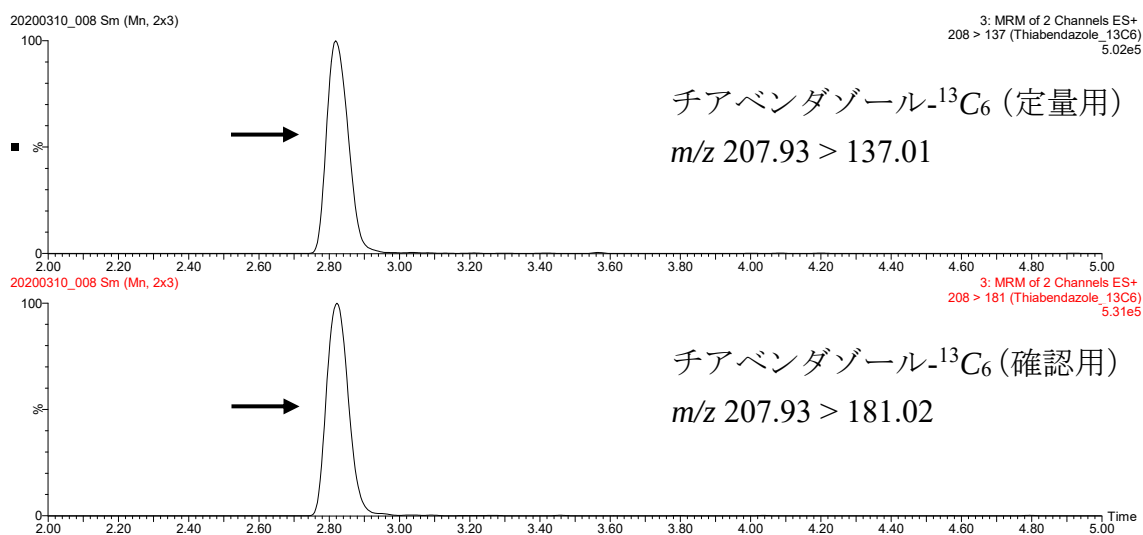


図 5-7 標準液のクロマトグラム (チアベンダゾール- $^{13}C_6$: 10 ng/mL)

〔マススペクトル〕

各物質のマススペクトル及びプレカーサーイオンに対するプロダクトイオンを図 6-1～6-7 に示す。

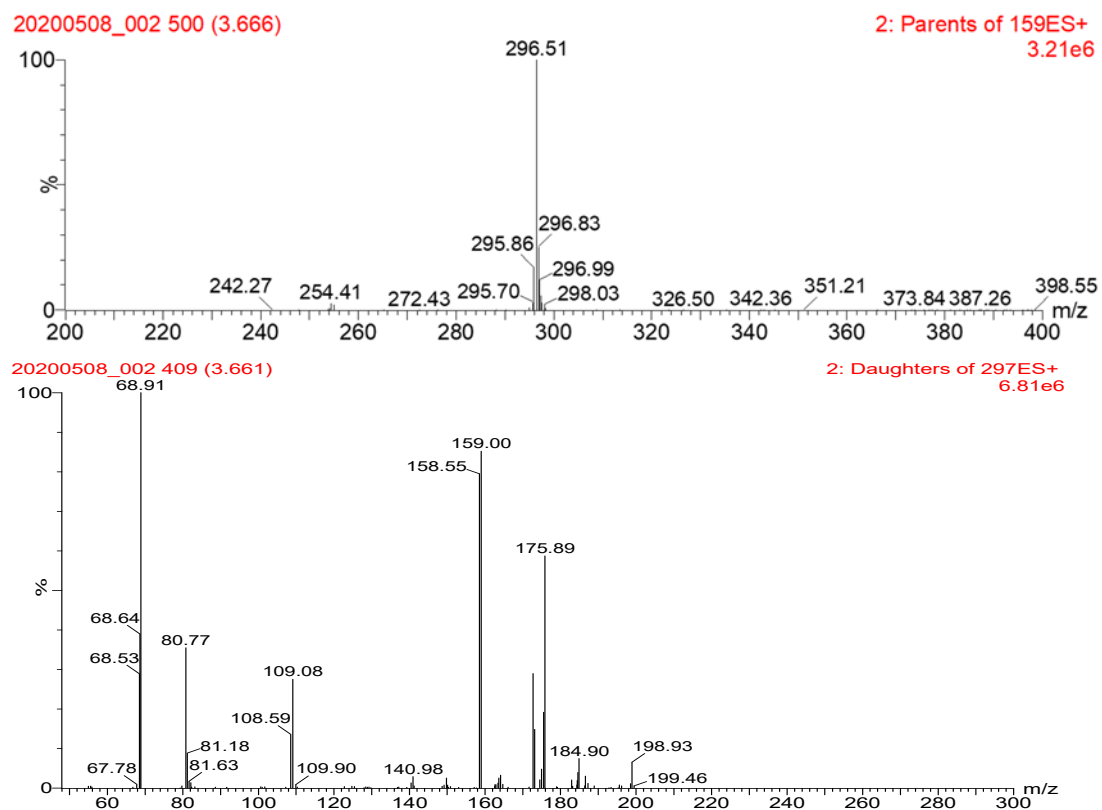


図 6-1 イマザリルのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 297.00 に対するプロダクトイオン（下図、ES(+), Collision Energy 18 eV)

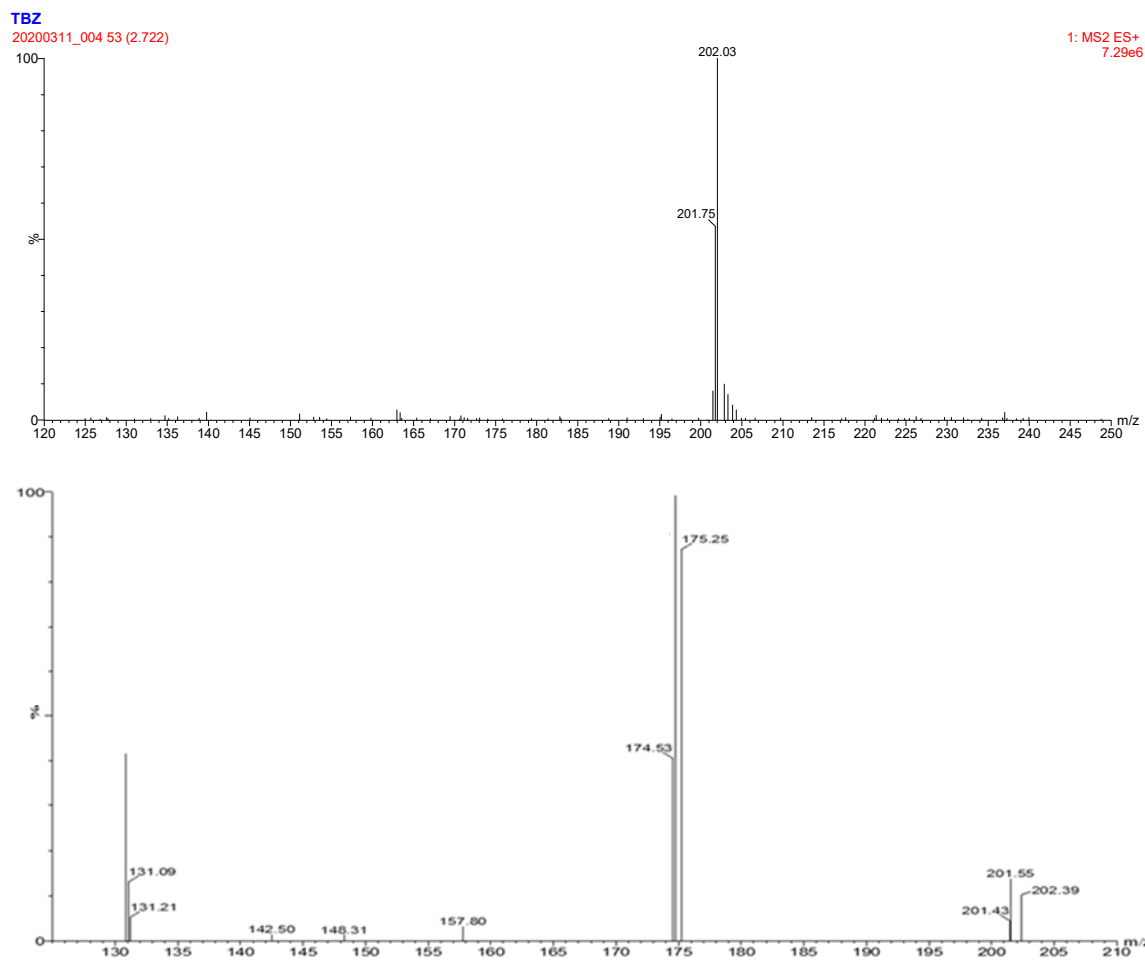


図 6-2 チアベンダゾールのマススペクトル (上図) 及びプレカーサーイオン m/z 202.03 に対するプロダクトイオン (下図、ES(+), Collision Energy 26 eV)

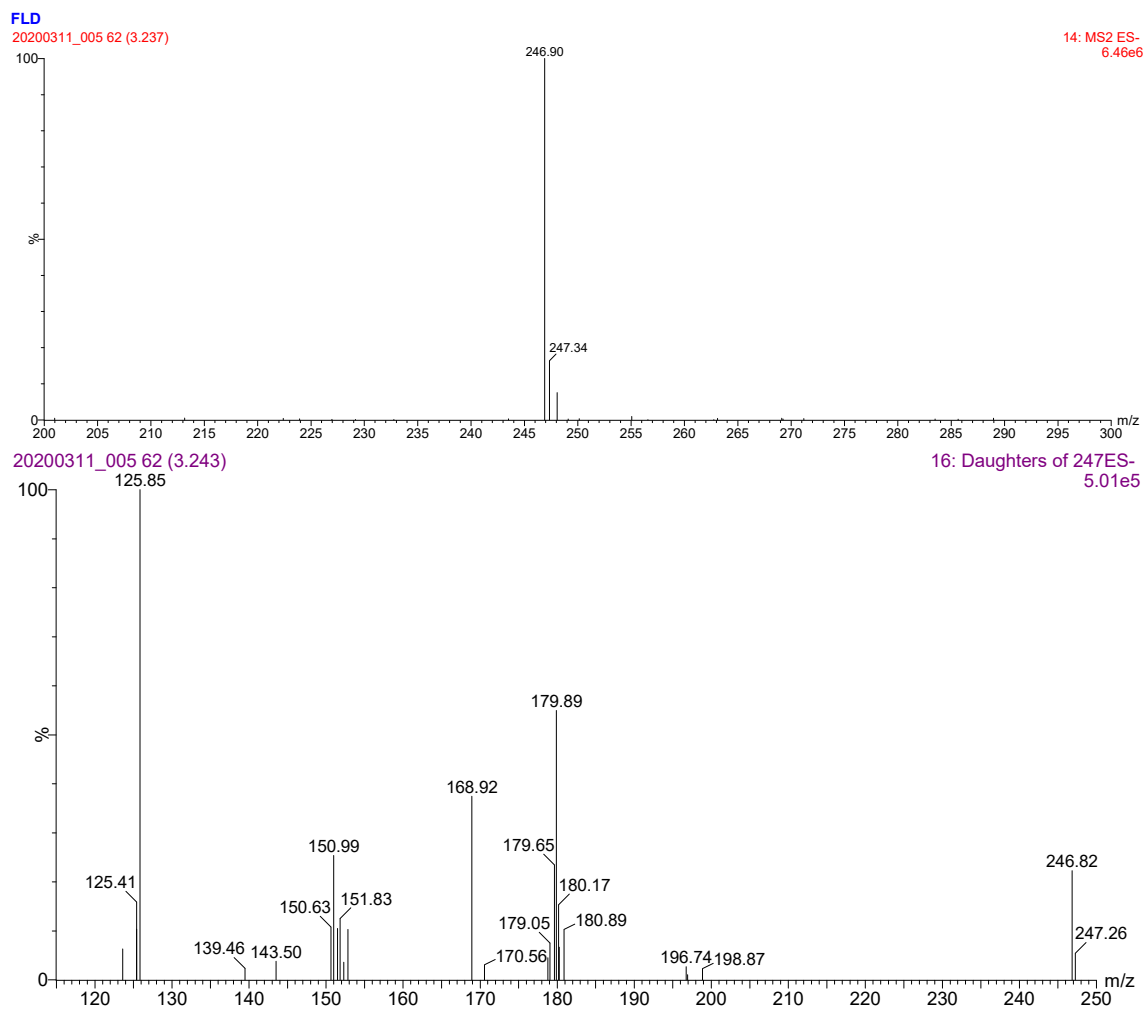


図 6-3 フルジオキシニルのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 246.90 に対するプロダクトイオン（下図、ES(-), Collision Energy 30 eV)

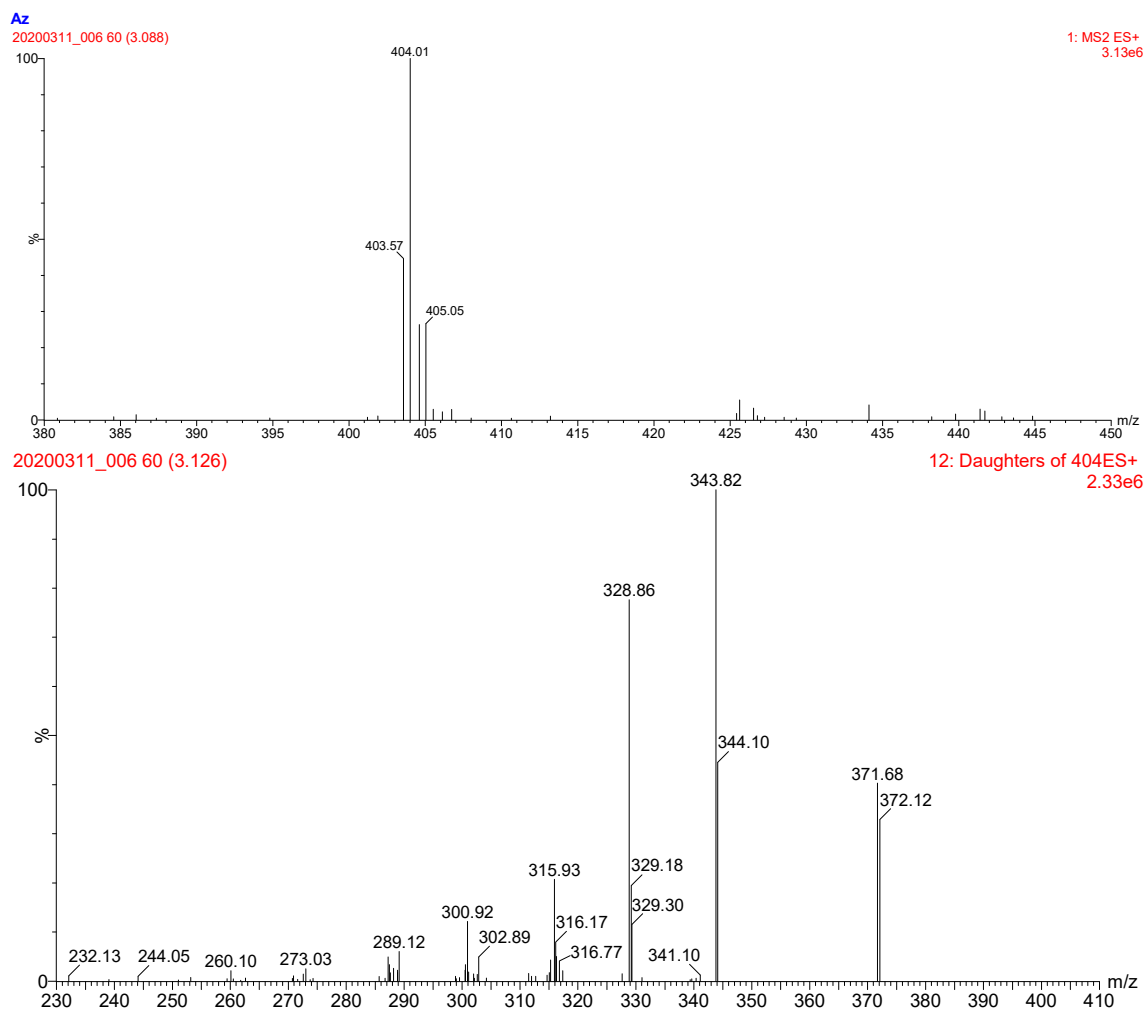


図 6-4 アゾキシストロビンのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 404.10 に対するプロダクトイオン（下図、ES(+), Collision Energy 26 eV)

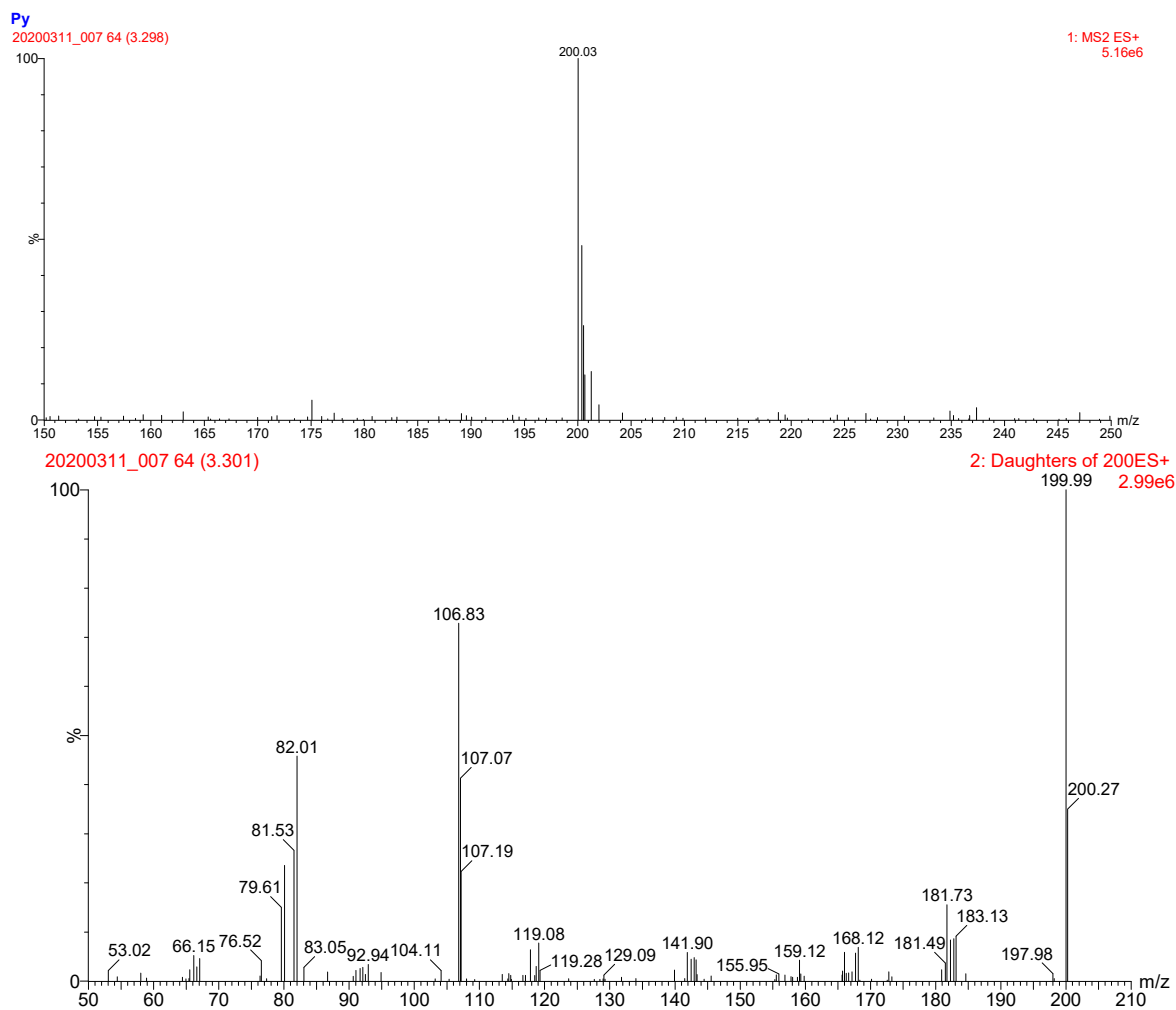


図 6-5 ピリメタニルのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 200.03 に対するプロダクトイオン（下図、ES(+), Collision Energy 26 eV)

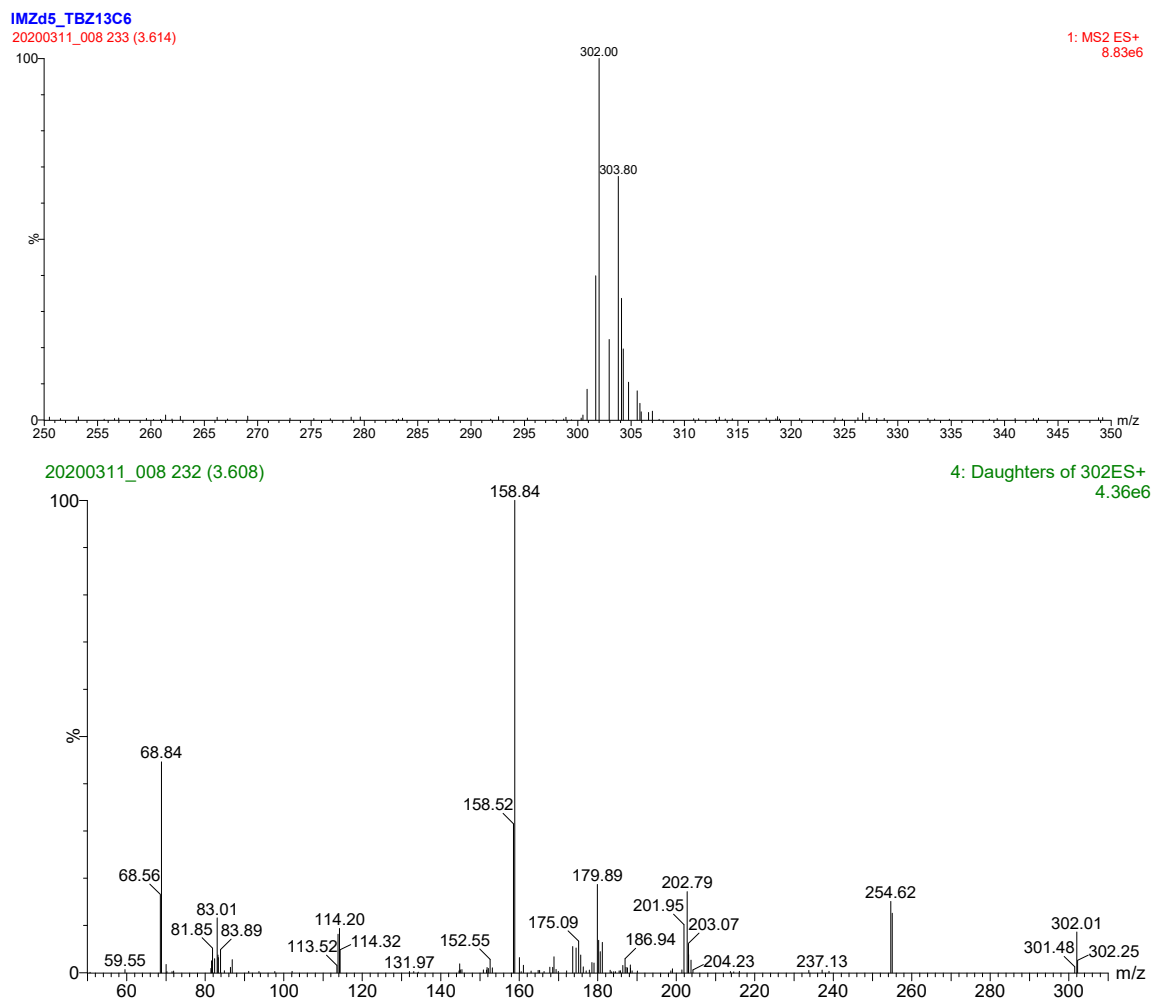


図 6-6 イマザリル- d_5 のマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 302.00 に対するプロダクトイオン（下図、ES(+), Collision Energy 24 eV）

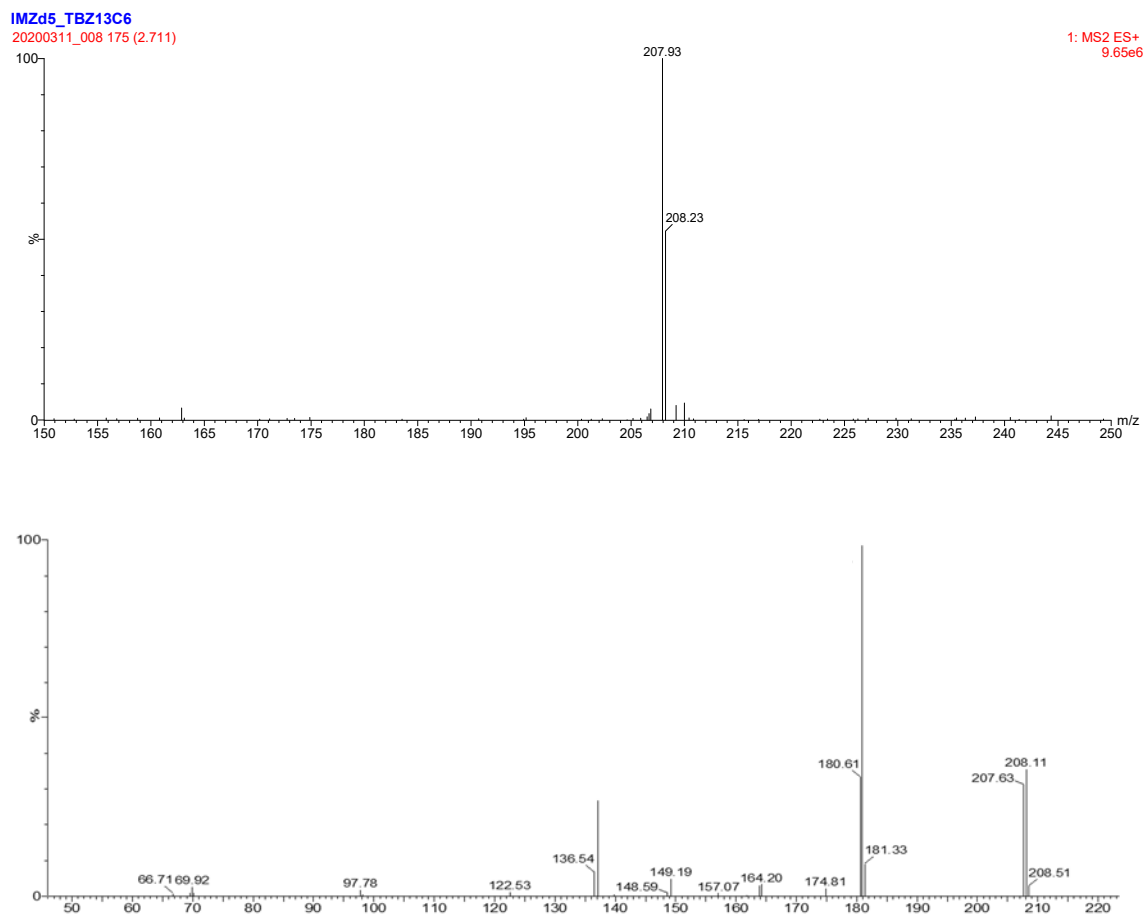


図 6-7 チアベンダゾール- $^{13}\text{C}_6$ のマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 207.93 に対するプロダクトイオン（下図、ES(+), Collision Energy 32 eV)

〔操作ブランク試験〕

各測定対象物質の操作ブランク試験のクロマトグラムを図7に示す。全ての測定対象物質についてMDL以上のピークは確認されなかった。

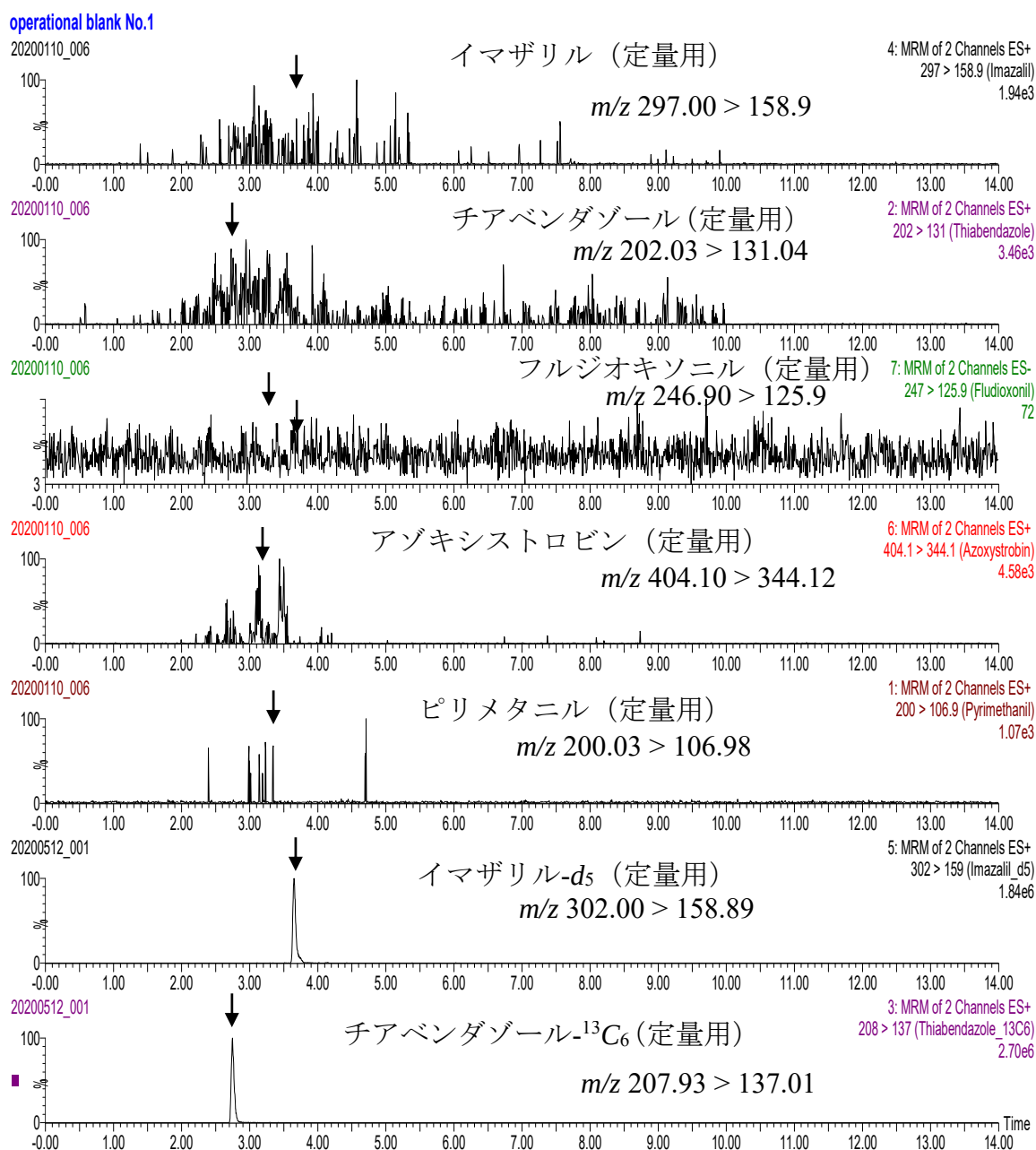


図7 各対象物質の操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（布留川流末）、海水（大阪湾）への各標準物質の添加回収試験結果を表 6-1～6-5 に、クロマトグラムを図 8-1～8-5 に示す。全ての対象物質で、回収率、変動係数ともに良好であった。

表 6-1 イマザリルの添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度* ($\mu\text{g/L}$)	回収率* (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
イマザリル	河川水	0.10	0	5.0	2	<0.0039	-	-	100
		0.10	0.0010	5.0	7	0.010	102	9.8	97
	海水	0.10	0	5.0	2	<0.0039	-	-	100
		0.10	0.010	5.0	7	0.097	97	5.3	101

*：検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

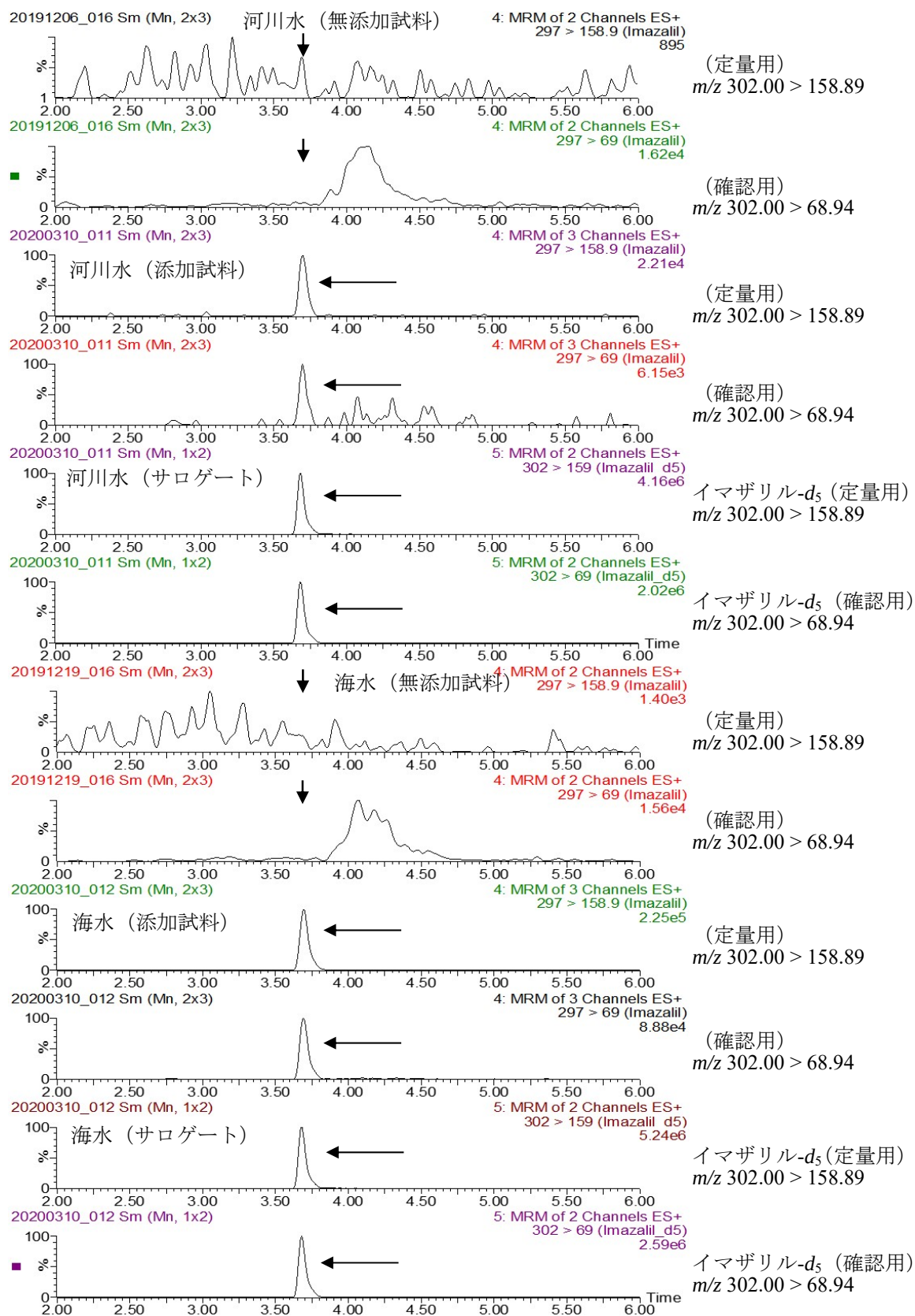


図 8-1 イマザリルの添加回収試験のクロマトグラム

表 6-2 チアベンダゾールの添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終 液量 (mL)	試験数	検出 濃度* (μg/L)	回収率* (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
チアベン ダゾール	河川水	0.10	0	5.0	2	<0.0013	-	-	100
		0.10	0.0010	5.0	7	0.010	101	3.4	115
	海水	0.10	0	5.0	2	<0.0013	-	-	97
		0.10	0.010	5.0	7	0.097	97	3.3	100

*：検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

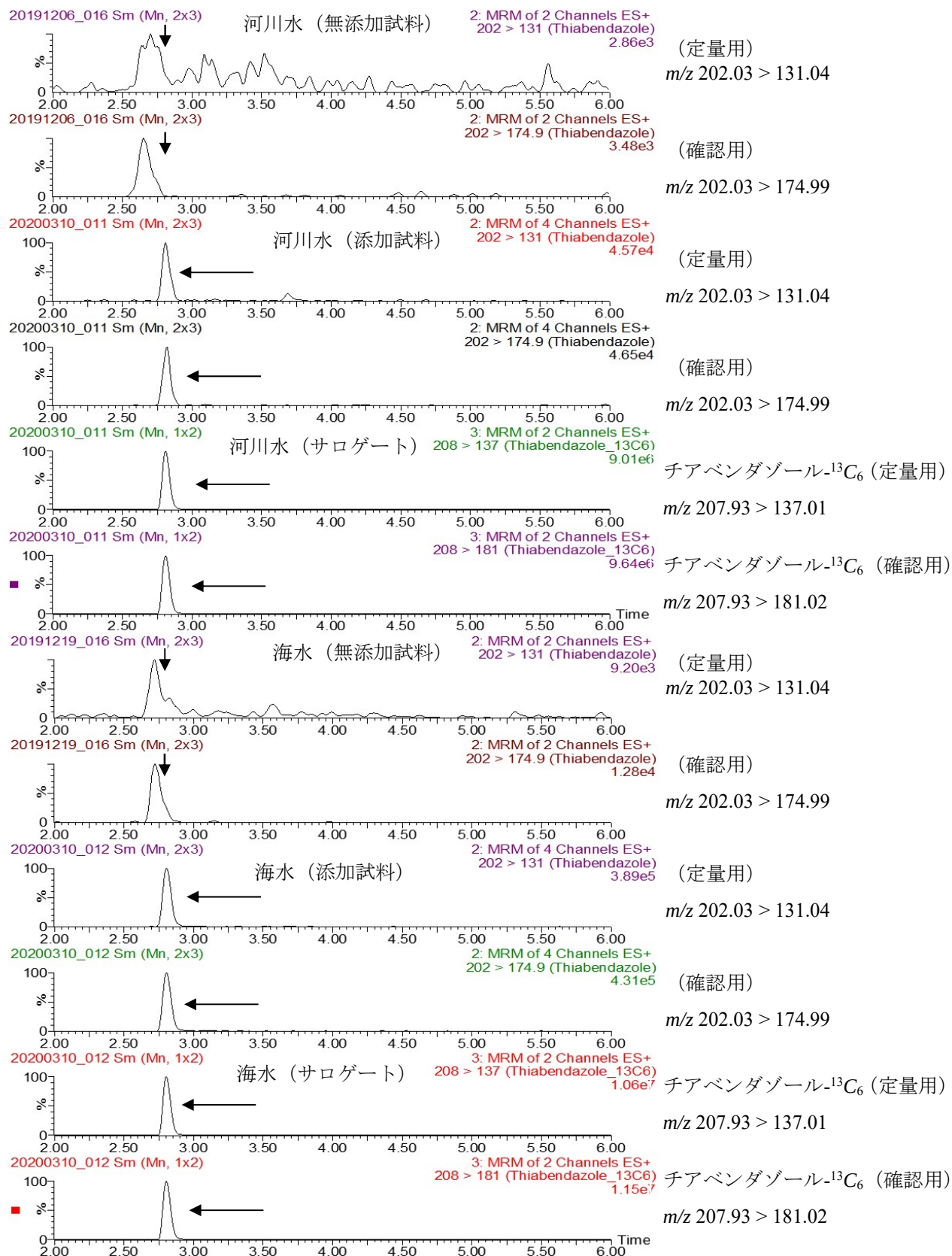


図 8-2 チアベンダゾールの添加回収試験のクロマトグラム

表 6-3 フルジオキシソニルの添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収 率(%)	変動 係数(%)
フルジオキシ ソニル	河川水	0.10	0	5.0	2	<0.0056	-	-
		0.10	0.0010	5.0	7	0.0090	90	16
	海水	0.10	0	5.0	2	<0.0056	-	-
		0.10	0.010	5.0	7	0.10	100	2.6

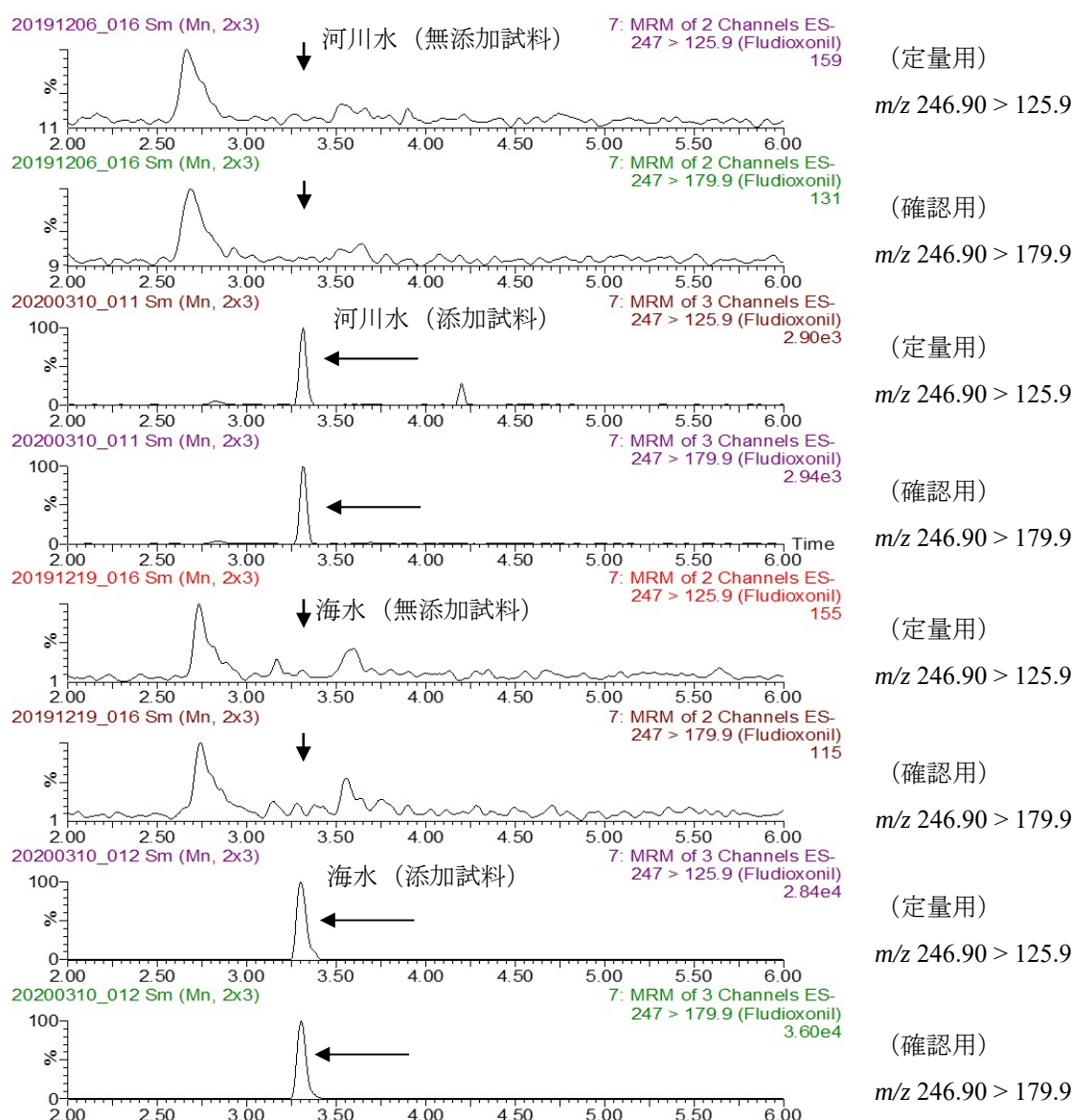


図 8-3 フルジオキシソニルの添加回収試験のクロマトグラム

表 6-4 アゾキシストロビンの添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終 液量 (mL)	試験数	検出 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収 率 (%)	変動 係数 (%)
アゾキシ ストロビ ン	河川水	0.10	0	5.0	2	<0.0024	-	-
		0.10	0.0010	5.0	7	0.010	100	6.3
	海水	0.10	0	5.0	2	<0.0024	-	-
		0.10	0.010	5.0	7	0.10	102	1.9

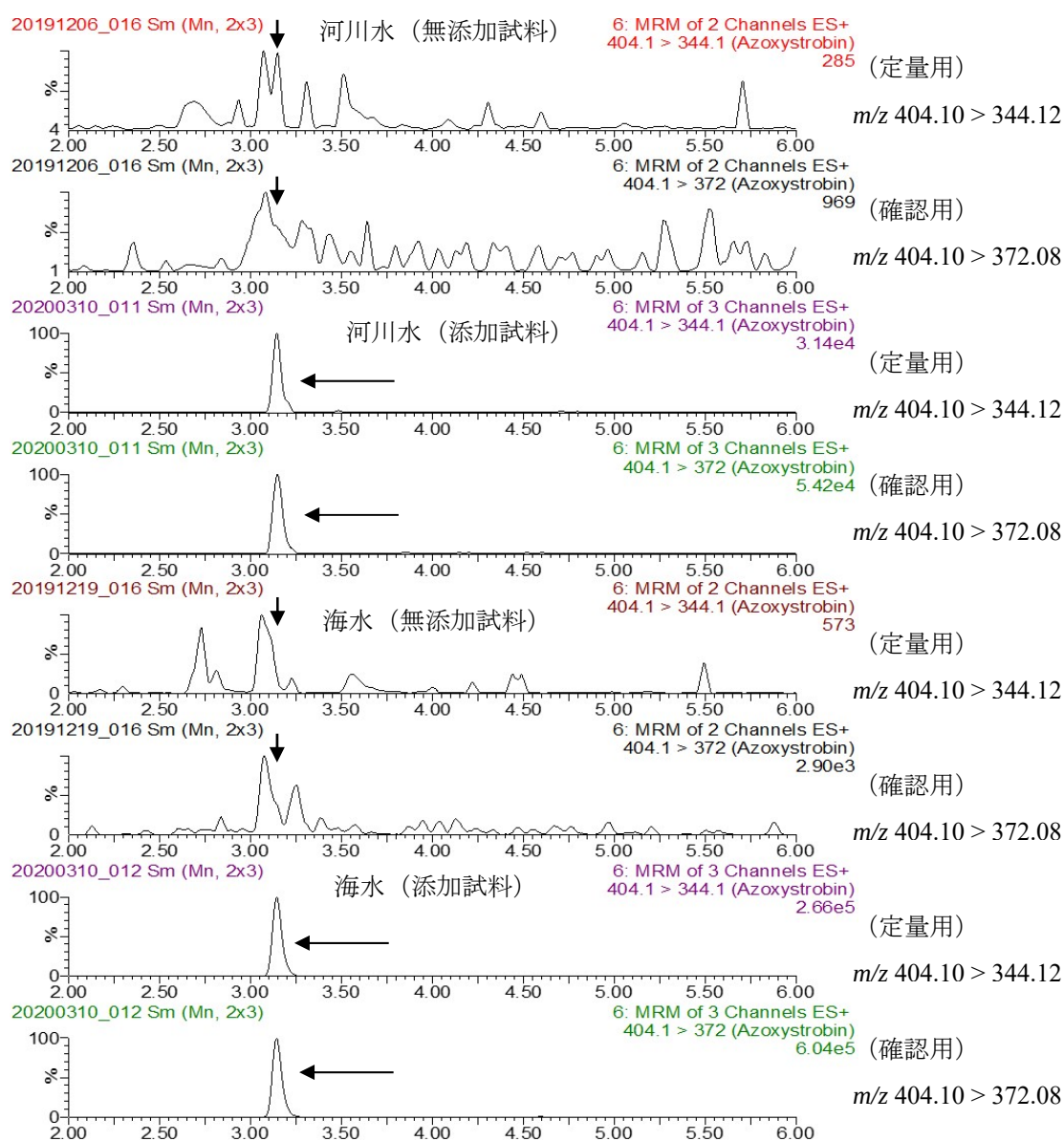


図 8-4 アゾキシストロビンの添加回収試験のクロマトグラム

表 6-5 ピリメタニルの添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収 率 (%)	変動 係数 (%)
ピリメタ ニル	河川水	0.10	0	5.0	2	<0.0051	-	-
		0.10	0.0010	5.0	7	0.011	111	12
	海水	0.10	0	5.0	2	<0.0051	-	-
		0.10	0.010	5.0	7	0.10	100	3.6

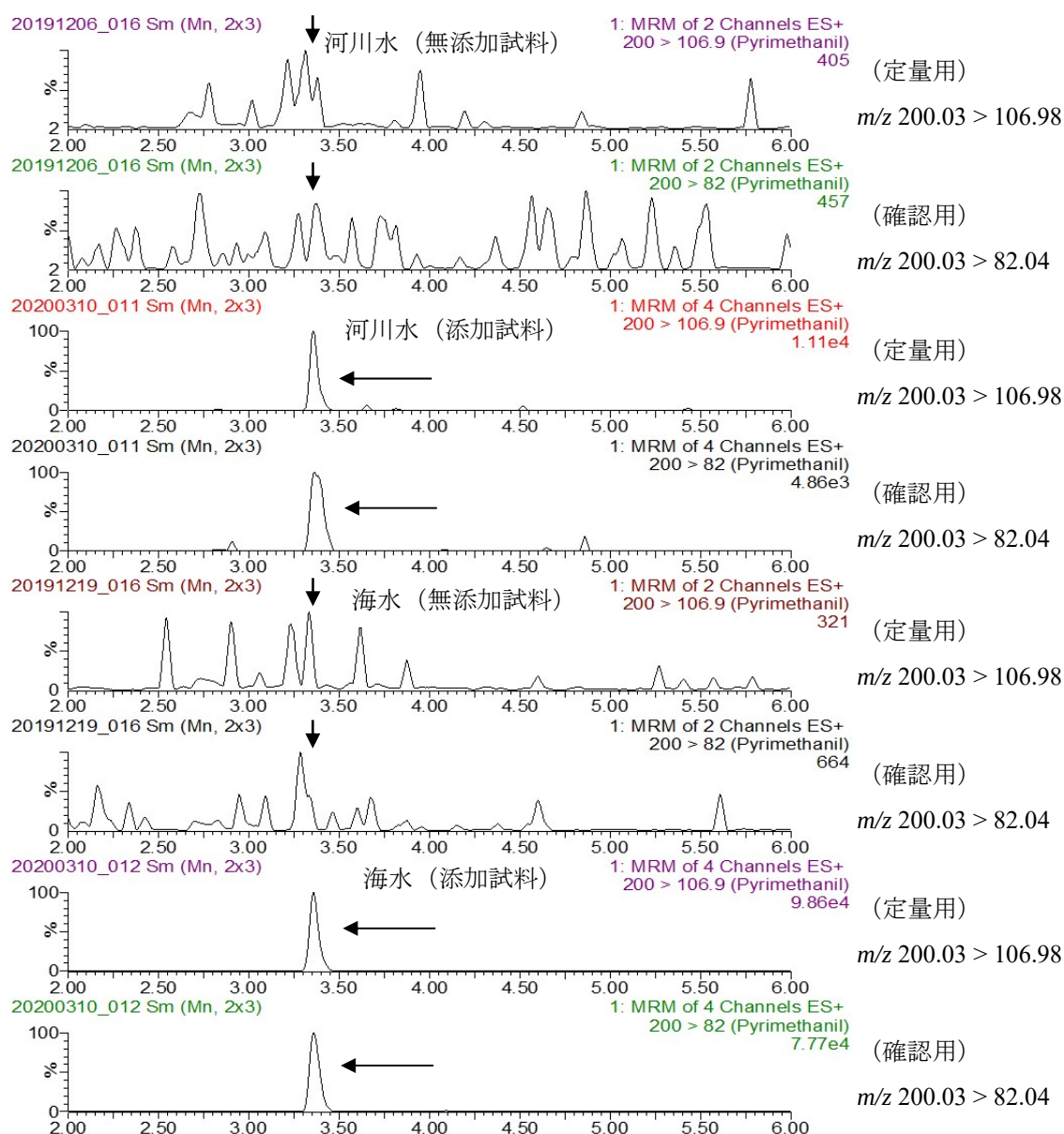


図 8-5 ピリメタニルの添加回収試験のクロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験〕

ギ酸及びアンモニア水を用いて pH 調整した精製水に対象物質を添加し、分解性スクリーニング試験を行った。結果を表 7-1～7-5 に示す。

pH 及び明暗によらず、分解は確認されなかった。

表 7-1 分解性スクリーニング試験結果（イマザリル）

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	5.0	4.90 (98)	5.20 (104)	-
7	2	5.0	5.00 (100)	5.20 (104)	5.05 (101)
9	2	5.0	5.05 (101)	5.10 (102)	-

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 7-2 分解性スクリーニング試験結果（チアベンダゾール）

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	5.0	5.10 (102)	4.80 (96)	-
7	2	5.0	5.15 (103)	5.15 (103)	5.20 (104)
9	2	5.0	5.05 (101)	4.95 (99)	-

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 7-3 分解性スクリーニング試験結果（フルジオキシニル）

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	5.0	4.45 (89)	4.85 (97)	-
7	2	5.0	4.90 (98)	4.90 (98)	5.00 (100)
9	2	5.0	4.95 (99)	4.95 (99)	-

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 7-4 分解性スクリーニング試験結果（アゾキシストロビン）

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	5.0	4.95 (99)	5.10 (102)	
7	2	5.0	4.95 (99)	5.30 (106)	4.85 (97)
9	2	5.0	5.10 (102)	4.85 (97)	

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 7-5 分解性スクリーニング試験結果（ピリメタニル）

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	5.0	4.70 (94)	5.30 (106)	-
7	2	5.0	5.05 (101)	5.20 (104)	5.30 (106)
9	2	5.0	5.10 (102)	5.25 (105)	-

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

河川水、海水及び標準液を用いた保存性試験結果を表 8-1～8-5 に示す。

河川水（布留川（B 類型））試料 100 mL に、対象物質 5 成分をそれぞれ 5.0 ng ずつ添加し、7 日間冷蔵保存し、固相抽出等の前処理を行った後、濃度を測定した。海水（大阪湾）についても、河川水と同様、対象物質 5 成分をそれぞれ 5.0 ng ずつ添加し、7 日間冷蔵保存して試験を行った。

試験液については、添加回収試験（河川水・海水）の抽出液（メタノール溶液）を LC/MS/MS 用の 2 mL バイアル容器に入れた状態で冷蔵保存し、2 週間後に再測定し、残存率を求めた。

標準液については、検量線用標準液を 2 mL バイアル容器に入れた状態で冷蔵保存し、1 か月後に測定した。

河川水、海水、標準液について、全ての対象物質について保存性は良好であった。

表 8-1 保存性試験結果（イマザリル）

試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
		7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	1.0	0.96 (96)	-
	試験液	1.0	-	0.93 (93)
海水	試料	1.0	1.04 (104)	-
	試験液	2.0	-	1.9 (97)
標準液	MDL の 10 倍程度	0.50	-	-
	検量線最高濃度	100	-	0.45 (90)
				108 (108)

表 8-2 保存性試験結果（チアベンダゾール）

試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
		7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	1.0	1.0 (100)	-
	試験液	1.0	-	0.93(93)
海水	試料	1.0	1.0 (103)	-
	試験液	2.0	-	2.1 (105)
標準液	MDL の 10 倍程度	0.50	-	-
	検量線最高濃度	100	-	0.50 (100)
				103 (103)

表 8-3 保存性試験結果（フルジオキシニル）

試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
		7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	1.0	1.0 (100)	-
	試験液	1.0	-	0.76 (76)
海水	試料	1.0	0.96 (96.5)	-
	試験液	2.0	-	2.1 (105)
標準液	MDL の 10 倍程度	0.50	-	-
	検量線最高濃度	100	-	0.50 (100)
				101 (101)

表 8-4 保存性試験結果（アゾキシストロビン）

試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
		7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	1.0	1.0 (100)	-
	試験液	1.0	-	1.0 (100)
海水	試料	1.0	1.0 (105)	-
	試験液	2.0	-	2.0 (103)
標準液	MDL の 10 倍程度	0.50	-	-
	検量線最高濃度	100	-	-

表 8-5 保存性試験結果（ピリメタニル）

試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）		
		7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	1.0	0.90 (90)	-
	試験液	1.0	-	0.85 (85)
海水	試料	1.0	1.03 (103)	-
	試験液	2.0	-	2.1 (105)
標準液	MDL の 10 倍程度	0.50	-	-
	検量線最高濃度	100	-	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔LC 用カラムの検討〕

LC 用カラムは、Waters 製 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (2.1 mm×100 mm, 2 μm) の 2 種類を用いて分離状況を検討した。対象物質の濃度は 100 ng/mL とした。それぞれの SRM クロマトグラムを図 9-1～9-2 に示す。ピーク形状を比較した結果、対象物質全てにおいて L-column2 ODS を用いた場合ピーク幅が広く、ややテーリングがみられた。ACQUITY UPLC BEH C18 を用いた場合の方がシャープなピークが得られたため、LC 用分離カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 を用いることとした。

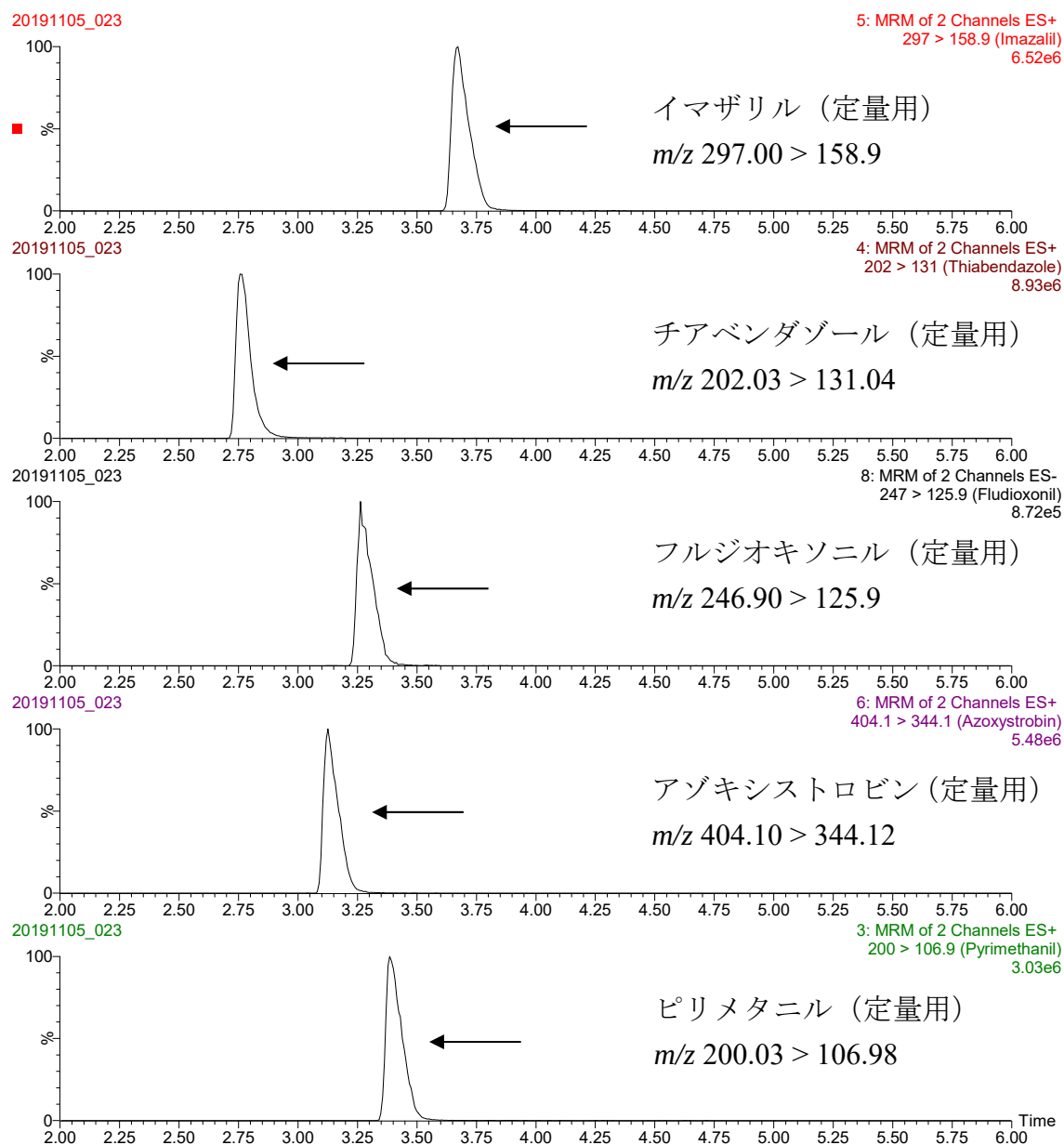
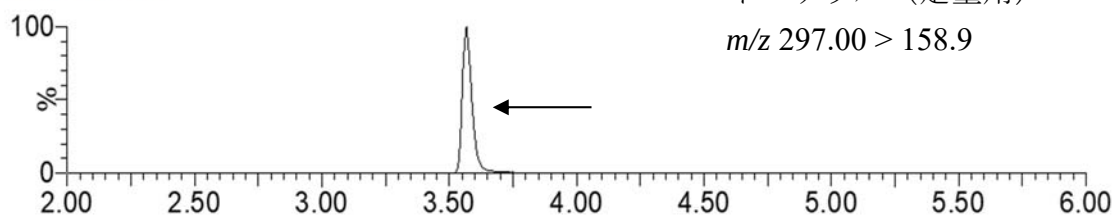


図 9-1 L-column2 ODS を用いた対象物質のクロマトグラム

20191113_018

イマザリル (定量用)

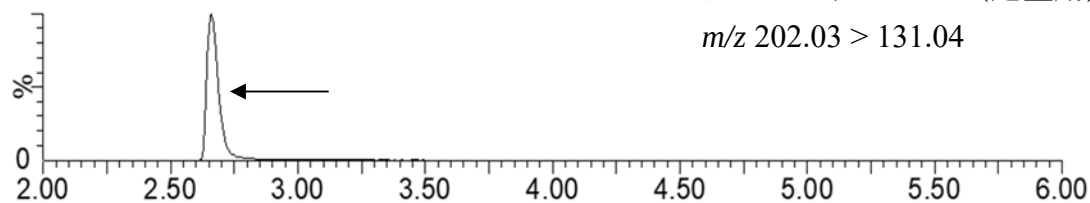
m/z 297.00 > 158.9



20191113_018

チアベンダゾール (定量用)

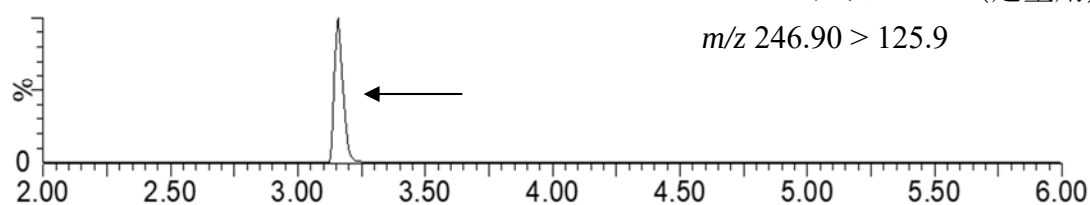
m/z 202.03 > 131.04



20191113_018

フルジオキシニル (定量用)

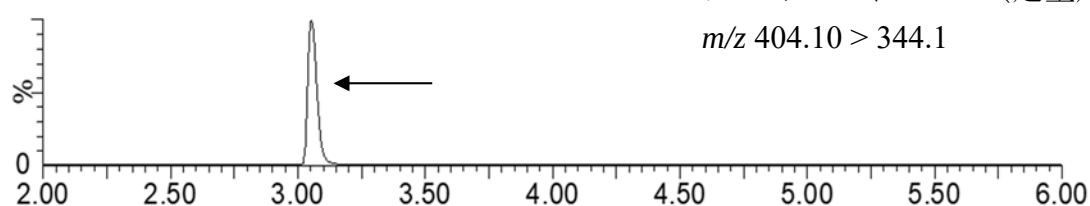
m/z 246.90 > 125.9



20191113_018

アゾキシストロビン (定量用)

m/z 404.10 > 344.1



20191113_018

ピリメタニル (定量用)

m/z 200.03 > 106.98

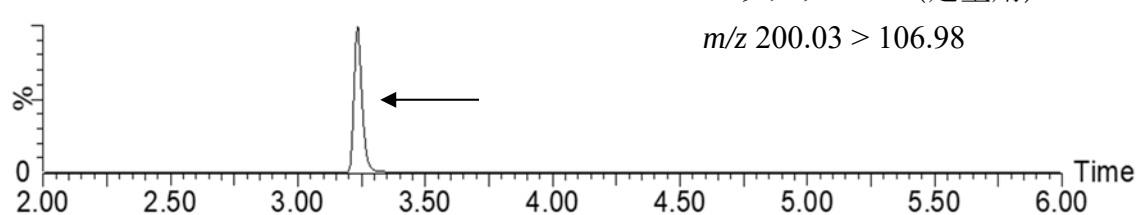


図 9-2 ACQUITY UPLC BEH C18 を用いた対象物質のクロマトグラム

〔移動相条件の検討〕

移動相条件として、水系は 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液とし、有機溶媒系に 5 mmol/L 酢酸アンモニウムを添加したメタノールと、添加していないメタノールで検討した。その際の SRM クロマトグラムを図 10-1～10-2 に示す。どちらもピーク形状に大きな違いはなく、保持時間もほぼ変化がなかったため、試薬の添加による汚染を防ぐため 5 mmol/L 酢酸アンモニウムを添加しないメタノールの条件を採用することとした。検討に用いた LC 条件は以下のとおり。

カラム : Waters 製 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)
 移動相 : A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
 B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール、またはメタノール

0	→	2 min	A : 90 → 20, B : 10 → 80 linear gradient
2	→	3 min	A : 20 → 10, B : 80 → 90 linear gradient
3	→	6 min	A : B = 10: 90
6	→	6.1 min	A : 10 → 5, B : 90 → 95 linear gradient
6.1	→	11 min	A : B = 5: 95
11	→	11.5 min	A : 5 → 90, B : 95 → 10 linear gradient
11.5	→	15 min	A : B = 90: 10

カラム流量 : 0.3 mL/min
 カラム温度 : 40°C
 注入量 : 5.0 μL
 注入溶媒 : メタノール
 注入濃度 : 100 ng/mL

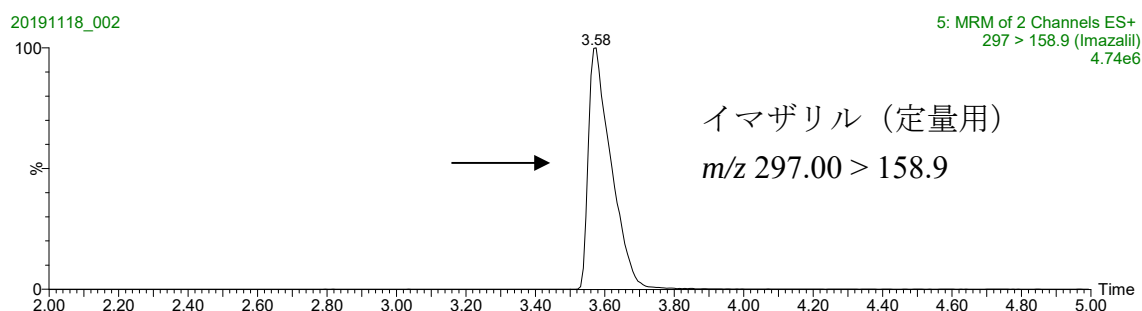


図 10-1 有機溶媒系に 5 mmol/L 酢酸アンモニウムを添加したメタノールを用いた時のイマザリルの SRM クロマトグラム (イマザリル : 100 ng/mL)

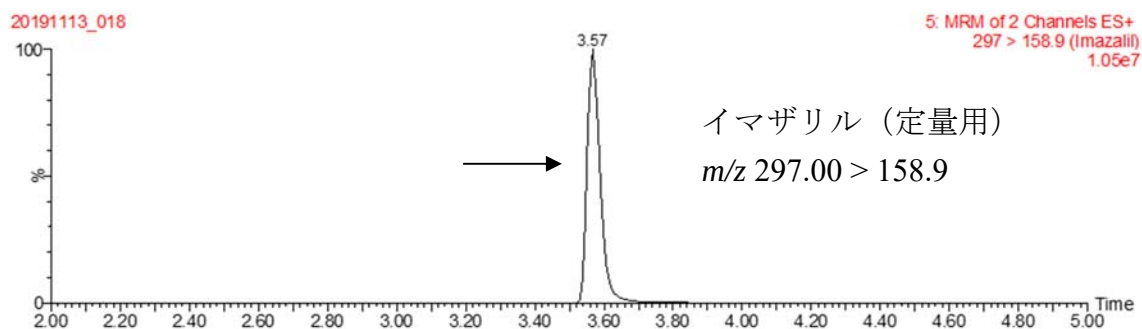


図 10-2 有機溶媒系をメタノールとした時のイマザリルの
SRM クロマトグラム (イマザリル : 100 ng/mL)

〔固相カートリッジの検討 (分画試験)〕

精製水に標準物質を添加した試料について、ポリマー充填剤 3 種 (GL Science 製 InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)、Waters 製 Oasis HLB (200 mg/6 mL)、Waters 製 Oasis HLB Prime (200 mg/6 mL))、シリカゲル系充填剤 2 種 (Agilent 製 Bond Elute C18 (500 mg/6 mL)、GL Science 製 InertSep C18 (500 mg/6 mL)) の計 5 種類の固相を用いて検討を行った。溶出溶媒はメタノールとアセトニトリルの 2 種類で検討した。分画試験は、メタノールについては 10 mL までは 1 mL ずつ分画し、その後は 15 mL まで 5 mL 溶出した。アセトニトリルについては 10 mL までは 2 mL ずつ分画し、その後は 15 mL まで 5 mL 溶出した。装置注入量は 5 μ L とした。結果を表 9-1～9-5 に示す。

溶出溶媒がメタノールの場合、いずれの対象物質も 4 mL の溶出で添加量の 80%以上が回収できた。よって、どの固相カートリッジを用いた場合でも対象物質が固相カートリッジ内に適切に保持されることを確認した。一方、アセトニトリルで溶出させた場合、固相カートリッジの充填剤によって対象物質が溶出するタイミングが大きく変動した。InertSep PLS-2 及び OASIS HLB では 6 mL 程度の溶出で対象物質の添加量の 80%以上が回収されたが、OASIS HLB Prime では 6 mL 以降の分画において対象物質が溶出した。また、Bond Elute C18 ではイマザリルは回収できず、InertSep C18 でもイマザリルを 80%以上回収するのに、溶出溶媒を 10 mL 程度必要とした。固相抽出後の濃縮操作をなるべく簡便化させることも踏まえると、アセトニトリル 10 mL 以上の溶出が必要な OASIS HLB Prime および C18 カラムは本分析法に適さず、InertSep PLS-2 および OASIS HLB が本分析法に用いるのに望ましいと判断された。

〔固相カートリッジの検討 (環境試料の添加回収試験)〕

次に、各固相カートリッジの精製効率を比較するため、マトリックスを多く含む環境試料 (類型 D 相当の河川水、BOD 値 7.5 mg/L) を用いた添加回収試験を

実施した。固相カートリッジはポリマー充填剤 2 種 (InertSep PLS-2、Oasis HLB)、シリカゲル系充填剤 1 種 (Bond Elute C18) の計 3 種類の固相を用い、溶出溶媒はメタノール (溶出量 4 mL) とアセトニトリル (溶出量 6 mL) とした。他条件は【試料の前処理及び試験液の調製】に従い、溶出液はメタノール 1 mL に転溶した。また、LC/MS/MS への注入量は 5 μ L および 1 μ L とし、試料中のマトリックスの影響を検証した。結果を表 9-1～9-5 に示す。

溶出溶媒別に結果を比較すると、いずれの対象物質についても、メタノールよりアセトニトリルの方が、添加回収率が高くなる傾向を示した。ただし、Bond Elute C18/アセトニトリル溶出の条件では、分画試験と同様、イマザリルを回収できなかった。また、各対象物質に共通して、InertSep PLS-2/アセトニトリル溶出での添加回収率が最も高くなる傾向を示した。

装置注入量については、全ての物質に共通して、装置注入量が少ない (5 μ L よりも 1 μ L の) 条件で添加回収率が改善した。四ノ宮 (2016)⁴⁾は、アゾキシストロビンを含む LC-MS/MS 測定で測定可能な農薬 42 成分を対象に河川水中農薬分析におけるマトリックス効果について検証し、30～50%のイオン化抑制を示す試料液は 5 倍希釈することにより 10%未満の抑制にできることを報告している。以上から、装置注入量が添加回収率に影響を与えた原因としては、添加回収試験に用いたマトリックスの多い試料による対象物質へのイオン化阻害 (イオンサプレッション) の影響が考えられた。

なお、メタノール溶出した溶出液には試料中のマトリックス由来と思われる着色が見られたが、アセトニトリル溶出では着色は確認されなかった。両溶媒の溶出した検液いずれも、装置注入量を減少させることで添加回収率が改善したことに加え、アセトニトリル溶出と比べてメタノール溶出の添加回収率が低いことから、メタノール溶出の方が検液中により多くのマトリックス成分を溶出させていたと考えられた。

表 9-1 イマザリルのミニカラム別溶出試験、添加回収試験結果

ミニカラム	溶媒	Fraction [mL] ○ : 80% recovery						添加回収率 (%) (n=1)		比率 : ①/② (Matrix効果)	備考
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-15	①5μL injection	②1μL injection		
InertSep PLS-2	MeCN							94.6	104.7	0.90	溶出量6mLで 添加回収試験 を実施
OASIS HLB								83.3	95.6	0.87	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								0.9	0.7	-	
InertSep C18								-	-	-	
InertSep PLS-2	MeOH							72.8	76.2	0.96	溶出量4mLで 添加回収試験 を実施
OASIS HLB								78.1	89.4	0.87	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								80.3	88.7	0.91	
InertSep C18								-	-	-	

表 9-2 フルジオキソニルのミニカラム別溶出試験、添加回収試験結果

ミニカラム	溶媒	Fraction [mL] ○ : 80% recovery						添加回収率 (%) (n=1)		比率 : ①/② (Matrix効果)	備考
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-15	①5μL injection	②1μL injection		
InertSep PLS-2	MeCN							96.8	104.9	0.92	-
OASIS HLB								90.6	99.0	0.92	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								91.2	103.7	0.88	
InertSep C18								-	-	-	
InertSep PLS-2	MeOH							73.5	75.6	0.97	-
OASIS HLB								81.1	90.1	0.90	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								88.0	98.6	0.89	
InertSep C18								-	-	-	

表 9-3 アゾキシストロビンのミニカラム別溶出試験、添加回収試験結果

ミニカラム	溶媒	Fraction [mL] ○ : 80% recovery						添加回収率 (%) (n=1)		比率 : ①/② (Matrix効果)	備考
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-15	①5μL injection	②1μL injection		
InertSep PLS-2	MeCN							86.6	104.1	0.83	
OASIS HLB								74.9	97.0	0.77	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								83.1	89.9	0.92	
InertSep C18								-	-	-	
InertSep PLS-2	MeOH							62.6	74.0	0.85	
OASIS HLB								63.8	85.3	0.75	
OASIS HLB Prime								-	-	-	
Bond elute C18								75.2	96.6	0.78	
InertSep C18								-	-	-	

表 9-4 チアベンダゾールのミニカラム別溶出試験、添加回収試験結果

ミニカラム	溶媒	Fraction [mL] ○ : 80% recovery						添加回収率 (%) (n=1)		比率 : ①/② (Matrix効果)	備考
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-15	①5μL injection	②1μL injection		
InertSep PLS-2	MeCN	○						69.8	97.6	0.72	インジェクション量を1μLにすることで試料中Matrixによるイオン化抑制影響が軽減
OASIS HLB			○					43.3	72.0	0.60	
OASIS HLB Prime			○					-	-	-	
Bond elute C18								58.1	87.4	0.66	
InertSep C18			○					-	-	-	
InertSep PLS-2	MeOH							46.5	68.8	0.68	河川中matrixによるイオン化抑制影響がより大きくなる傾向
OASIS HLB			○					40.1	72.2	0.56	
OASIS HLB Prime			○					-	-	-	
Bond elute C18			○					48.4	84.7	0.57	
InertSep C18		Not examined						-	-	-	

表 9-5 ピリメタニルのミニカラム別溶出試験、添加回収試験結果

ミニカラム	溶媒	Fraction [mL] ○ : 80% recovery						添加回収率 (%) (n=1)		比率 : ①/② (Matrix効果)	備考
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-15	①5μL injection	②1μL injection		
InertSep PLS-2	MeCN	○						98.2	103.6	0.95	
OASIS HLB			○					86.1	96.7	0.89	
OASIS HLB Prime			○					-	-	-	
Bond elute C18								95	104.4	0.91	
InertSep C18			○					-	-	-	
InertSep PLS-2	MeOH						○	66.3	69.5	0.95	
OASIS HLB				○				76.4	85.6	0.89	
OASIS HLB Prime			○					-	-	-	
Bond elute C18			○					88.4	95	0.93	
InertSep C18		Not examined						-	-	-	

〔装置注入量による IDL 値の影響 〕

本分析に用いた LC/MS/MS の注入液濃度別の IDL 試料換算値(ng/L)を表 10-1 (装置注入量 5 μL)、表 10-2 (装置注入量 1 μL) に示す。()内の値は変動係数(CV%)である。

装置注入量 1 μL では、注入液濃度 0.5 ng/mL 以上でしか IDL 算出の目安である S/N=10 を満たさなかった。

イマザリルに関しては、装置注入量 5 μL、注入濃度 0.1 ng/mL で調査要求感度(3.9 ng/mL) を満たし、CV 10%以下となった。装置注入量 1 μL、注入濃度 0.5 ng/mL との変動係数を比較するとほぼ同等であったが、他の対象物質で高い変動係数となるものがあり、また S/N 比が非常に低い値を示すものもあった。よって全ての対象物質で安定した精度で測定が可能な、装置注入量 5 μL、注入濃度 0.1 ng/mL で IDL を測定することとした。

なお、添加回収試験についてはマトリックス効果により装置注入量 1 μL の方が回収率が高いという結果が得られている（〔固相カートリッジの検討（環境試料の添加回収試験）〕に記載）。そのため、分析法における最終液量を 1 mL から 5 mL に変更（試料水を 100 倍濃縮から 20 倍濃縮に変更）し、装置注入量を 5 μL として MDL 算出、添加回収試験、分解性スクリーニング、保存性試験等を行うこととした。

表 10-1 装置注入量 5 μL での IDL 試料換算値(ng/L)（変動係数(%)）

物質名\注入液濃度	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	0.5 ng/mL	1 ng/mL
イマザリル	0.40 (11)	0.54 (6.8)	0.63 (3.0)	0.97 (2.3)
チアベンダゾール	0.51 (15)	0.32 (4.1)	0.74 (3.6)	1.2 (2.0)
フルジオキシニル	0.59 (12)	0.94 (13)	1.0 (5.0)	2.6 (6.3)
アゾキシストロビン	0.25 (7.5)	0.42 (5.4)	0.63 (3.2)	0.79 (2.0)
ピリメタニル	0.40 (12)	0.76 (10.2)	0.74 (3.8)	0.82 (2.0)

*：最終液量は 1 mL として計算

表 10-2 装置注入量 1 μL での IDL 試料換算値(ng/L)（変動係数(%)）

物質名\注入液濃度	0.5 ng/mL	1 ng/mL
イマザリル	1.2 (5.7)	2.3 (5.6)
チアベンダゾール	0.99 (4.6)	1.9 (4.4)
フルジオキシニル	4.9 (23)	8.0 (20)
アゾキシストロビン	1.7 (7.7)	1.8 (4.2)
ピリメタニル	2.6 (13)	2.8 (7.1)

*：最終液量は 1 mL として計算

以上の結果より、固相カートリッジは InertSep PLS-2、溶出溶媒はアセトニトリル、最終液量は 5 mL、装置注入量 5 μL が本分析法における最適条件であることがわかった。

〔環境試料の分析〕

本法を用いて、奈良県内河川 13 地点について 2019 年 10 月、11 月、12 月に採水を実施し、本分析法によりイマザリル等 5 成分の残留実態について調査を行った。

その結果、1 地点においてフルジオキサニルが MDL 未満の濃度で検出され、7 地点においてアゾキシストロビンが MDL 未満～0.023 $\mu\text{g/L}$ の濃度で検出された。このうち、11 月に地点 A でフルジオキサニル及びアゾキシストロビンが検出された SRM クロマトグラムを図 11 に示す。

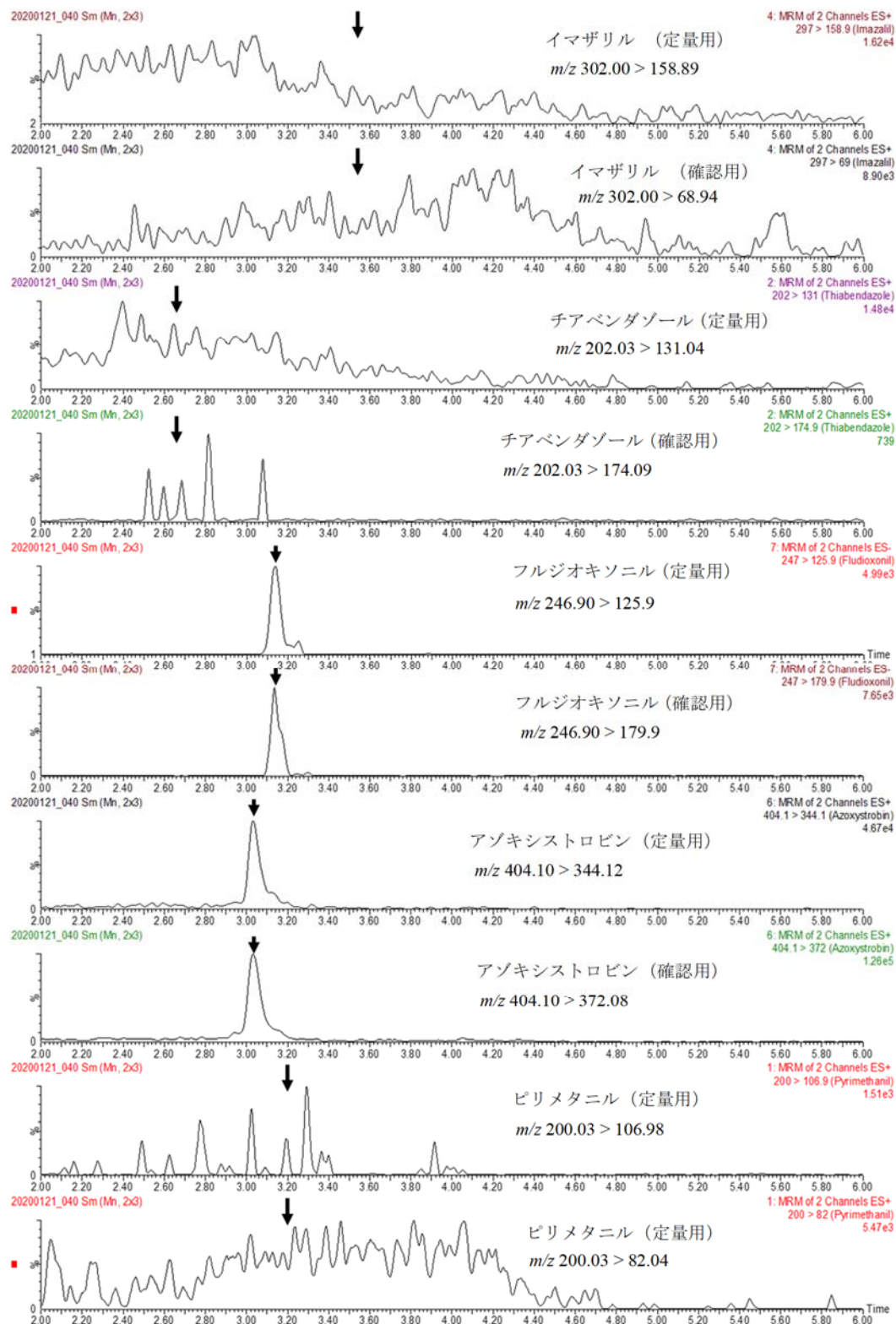


図 11 11 月の地点 A で検出したフルジオキシニル及び
アゾキシストロビンの SRM クロマトグラム

【評価】

環境水中に含まれるイマザリル、チアベンダゾール、フルジオキシニル、アゾキシストロビン、ピリメタニルの同時分析法を開発した。本法における、イマザリル、チアベンダゾール、フルジオキシニル、アゾキシストロビン、ピリメタニルの MDL はそれぞれ 0.0039 µg/L、0.0013 µg/L、0.0056 µg/L、0.0024 µg/L、0.0051 µg/L、MQL は 0.0099 µg/L、0.0034 µg/L、0.014 µg/L、0.0063 µg/L、0.013 µg/L であった。検量線はいずれの対象物質も 0.10～100 ng/mL の範囲で直線性が確認された。河川水を用いた添加回収試験では、イマザリルの回収率は 102% (サロゲート回収率 97%、変動係数 9.8%)、チアベンダゾールの回収率は 101% (サロゲート回収率 115%、変動係数 3.4%)、フルジオキシニルの回収率は 90% (変動係数 16%)、アゾキシストロビンの回収率は 100% (変動係数 6.3%)、ピリメタニルの回収率は 111% (変動係数 12%) であった。海水を用いた添加回収試験では、イマザリルの回収率は 97% (サロゲート回収率 101%、変動係数 5.3%)、チアベンダゾールの回収率は 97% (サロゲート回収率 100%、変動係数 3.3%)、フルジオキシニルの回収率は 100% (変動係数 2.6%)、アゾキシストロビンの回収率は 102% (変動係数 1.9%)、ピリメタニルの回収率は 100% (変動係数 3.6%) であった。本分析法では、操作ブランクからは全ての対象物質について MDL 以上のピークは確認されなかった。

本法により、奈良県内河川 13 地点について 2019 年 10 月、11 月、12 月に採水を実施し、5 成分の残留実態を調査したところ、7 地点においてフルジオキシニル、アゾキシストロビンのいずれかまたは両方が、MDL 未満の濃度で検出された。

以上の結果から本法は MQL よりイマザリルは 0.01 µg/L レベル、チアベンダゾールは 0.004 µg/L レベル、フルジオキシニルは 0.02 µg/L レベル、アゾキシストロビンは 0.007 µg/L レベル、ピリメタニルは 0.02 µg/L レベルの環境試料の定量に適用可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) 氏家あけみ, 紙本佳奈, 上田淳司, 安永恵: 輸入果実に残留する防かび剤の一斉分析法の検討. 香川県環境保健研究センター所報, 13, 58-61(2014)
- 2) 小木曾俊孝, 中西加奈子, 新谷依子, 永島聡子, 高橋浩司, 平川博仙, 堀就英, 梶原淳睦: 果実中防かび剤の分析法開発及び妥当性評価. 福岡県保健環境研究所年報, 43, 76-81(2016)
- 3) Kadokami K., Ueno D. : Comprehensive target analysis for 484 organic micropollutants in environmental waters by the combination of tandem solid-phase extraction and quadrupole time-of-flight mass spectrometry with sequential window acquisition of

- all theoretical fragment-ion spectra acquisition. *Anal. Chem*, 91, 7749-7755(2019)
- 4) 四ノ宮美保: LC-MS/MS による河川水中農薬分析におけるマトリックス効果.
環境科学, 26, 4, 191–201(2016)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 奈良県景観・環境総合センター
所属先住所 : 〒633-0062 奈良県桜井市栗殿 1000
TEL : 0744-47-3173 FAX : 0744-43-3416
担当者名 : 川辺 千明
E-mail : c.kawabe@ihe.pref.nara.jp

1-[2-(Allyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazole : imazalil

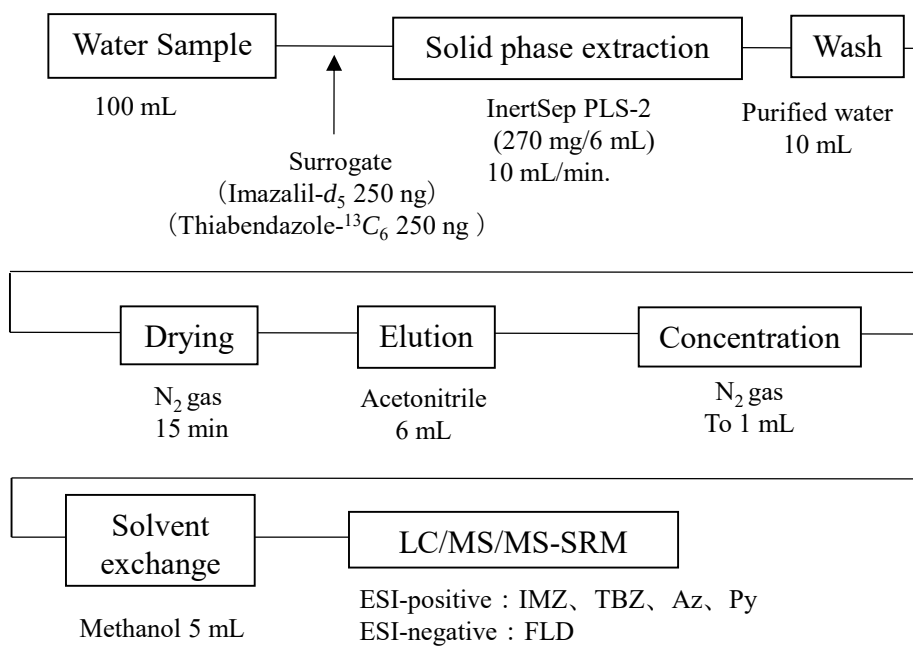
2-(1,3-Thiazol-4-yl)-1*H*-benzoimidazole : thiabendazole

4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1*H*-pyrrole-3-carbonitrile : fludioxonil

Methyl=(*E*)-2-(2-{[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxy}phenyl)-3-methoxyacrylate : azoxystrobin

4,6-Dimethyl-*N*-phenylpyrimidin-2-amine : pyrimethanil

A simultaneous analytical method by liquid-chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed for the determination of the five fungicides of imazalil, thiabendazole, fludioxonil, azoxystrobin and pyrimethanil in water. After adding two surrogate standards (250 ng of imazalil-*d*₅ and 250 ng of thiabendazole-¹³C₆) to 100 mL of water sample, the water sample is passed through an InertSep PLS-2 cartridge at the flow rate of 10 mL/min. The cartridge passed with inland water and sea water are respectively washed with 10 mL and 60 mL of purified water. Then, the cartridges are dehydrated by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes followed by passing nitrogen gas through the cartridges for 15 minutes. The analytes collected in the cartridge are eluted with 6 mL of acetonitrile. The eluate is concentrated under a gentle flow nitrogen gas at 40 deg C or lower. The final volume of the eluate is made up to 5 mL with methanol, and then, the concentration of analyte is determined by LC/MS/MS. The method detection limits (MDLs) of imazalil, thiabendazole, fludioxonil, azoxystrobin and pyrimethanil are 0.0039 µg/L, 0.0013 µg/L, 0.0056 µg/L, 0.0024 µg/L, 0.0051 µg/L, respectively. Average recoveries of imazalil, thiabendazole, fludioxonil, azoxystrobin and pyrimethanil from inland water were respectively 102%, 101%, 90%, 100% and 111%, and those from seawater were 97%, 97%, 100%, 102% and 100%, respectively. Fludioxonil and azoxystrobin were detected in some of river water samples in Nara prefecture.



物質名	分析法フローチャート	備 考
[1] 1-[2-(アリルオキシ)-2-(2,4-ジクロロフェニル)エチル]-1<i>H</i>-イミダゾール (別名: イマザリル) [2] 2-(1,3-チアゾール-4-イル)-1<i>H</i>-ベンゾイミダゾール (別名: チアベンダゾール) [3] 4-(2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-イル)-1<i>H</i>-ピロール-3-カルボニトリル (別名: フルジオキソニル) [4] メチル=(<i>E</i>)-2-(2-[[6-(2-シアノフェノキシ)ピリミジン-4-イル]オキシ]フェニル)-3-メトキシアクリレート (別名: アゾキシストロビン) [5] 4,6-ジメチル-<i>N</i>-フェニルピリミジン-2-アミン (別名: ピリメタニル)	【水質】 <pre> graph TD A[水質試料 100 mL] -- "サロゲート添加 (イマザリル-d₅ 250 ng) (チアベンダゾール-¹³C₆ 250 ng)" --> B[固相抽出 InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL) 10 mL/min] B --> C[洗浄 精製水 10 mL] C --> D[乾燥 N₂ 通気 15 min] D --> E[溶出 アセトニトリル 6 mL] E --> F[濃縮 N₂ 気流下 1 mL まで] F --> G[転溶 メタノール 5 mL] G --> H[LC/MS/MS-SRM] </pre> イマザリル, チアベンダゾール, アゾキシストロビン, ピリメタニル : ESI-positive フルジオキソニル: ESI-negative	分析原理 : LC/MS/MS-SRM IMZ, TBZ, FLD, Az, Py : ESI-positive FLD : ESI-negative 検出下限値 : 【水質】 (μg/L) [1] 0.0039 [2] 0.0013 [3] 0.0056 [4] 0.0024 [5] 0.0051 分析条件 : 機器 LC : Waters ACQUITY UPLC MS : Waters Xevo TQ MS カラム Waters ACQUITY UPLC BEH C18 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm

和歌山県環境衛生研究センター
[対象媒体：水質、底質]

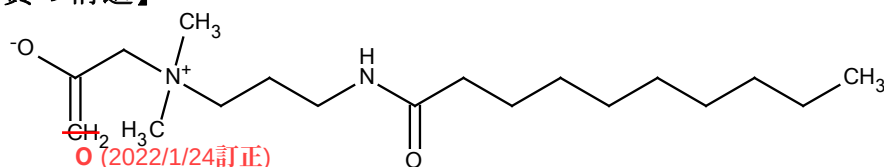
[(3-アルカンアミド-プロピル)(ジメチル)アンモニオ]
アセタート(アルカンアミドの炭素数が 10、12、
14、16 又は 18 で、直鎖型のもの)

又は(Z)-{[3-(オクタデカ-9-エンアミド)プロピ
ル](ジメチル)アンモニオ}アセタート

別名：アルキルアミドプロピルベタイン

Alkylamidopropyl betaine

【対象物質の構造】

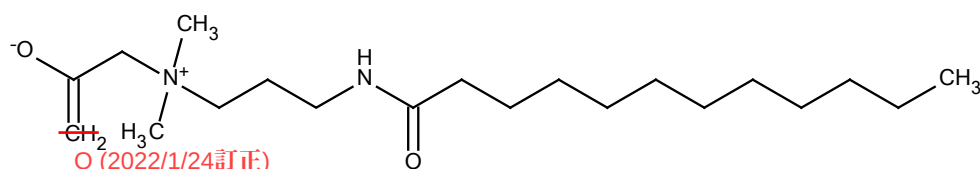


[(3-デカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート

CAS 番号：73772-45-9

分子式：C₁₇H₃₄N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₀」と表記する。)

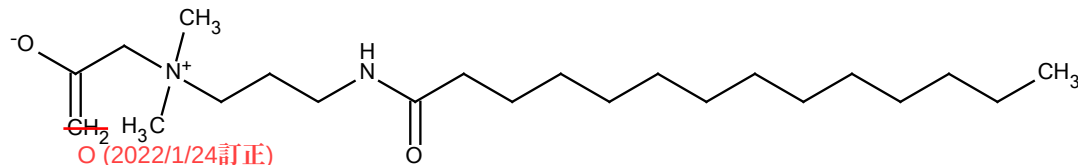


[(3-ドデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート

CAS 番号：4292-10-8

分子式：C₁₉H₃₈N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₂」と表記する。)

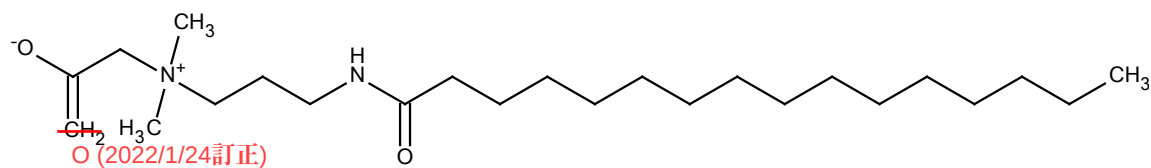


[(3-テトラデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート

CAS 番号：59272-84-3

分子式：C₂₁H₄₂N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₄」と表記する。)

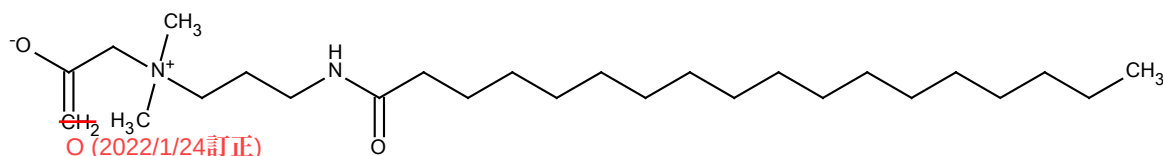


[(3-ヘキサデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート

CAS 番号：32954-43-1

分子式：C₂₃H₄₆N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₆」と表記する。)

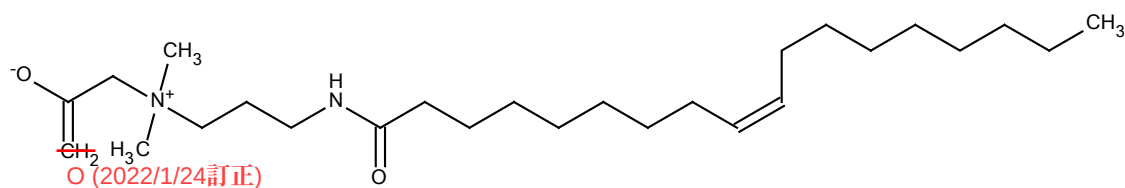


[(3-オクタデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート

CAS 番号：6179-44-8

分子式：C₂₅H₅₀N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₈」と表記する。)



(Z)-[3-(オクタデカ-9-エンアミド)プロピル](ジメチル)アンモニオ]
アセタート

CAS 番号：25054-76-6

分子式：C₂₅H₄₈N₂O₃

(以下「AAPB-C₁₈'」と表記する。)

【物理化学的性状】

物質名	分子量	モノアイソトピック質量
AAPB-C ₁₀	314.46	314.2569
AAPB-C ₁₂	342.52	342.2882
AAPB-C ₁₄	370.57	370.3195
AAPB-C ₁₆	398.62	398.3508
AAPB-C ₁₈	426.68	426.3821
AAPB-C ₁₈ '	424.66	424.3665

上記以外の情報はないため、[(3-ドデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート(AAPB-C₁₂)の例のみを示す。

項目	値	測定条件	備考	出典
融点	文献なし	-	-	
沸点	文献なし	-	-	
蒸気圧	文献なし	-	-	
分配係数(log P _{ow})	文献なし	-	-	
水溶解度	文献なし	-	-	

【毒性、用途等】

〔毒性〕

〔(3-ドデカンアミドプロピル)(ジメチル)アンモニオ〕アセタート (AAPB-C₁₂)の例を示す。

環境中運命（生分解性）：良分解性（分解性が良好と判断される物質）¹⁾

〔用途〕

医薬部外品添加物（薬用石けん、化粧品等）、殺菌剤¹⁾
防汚剤、洗剤等²⁾

出典

- 1) Webkis-plus（化学物質データベース）
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構ホームページ「化学物質総合情報提供システム(CHRIP)」

§1 分析法

(1) 分析法の概要

〔水質〕

水質試料を固相カートリッジに通水し、メタノール/精製水で洗浄し、メタノールで溶出・定容後、LC/MS/MS-SRM (ESI-positive) で定量する。

〔底質〕

底質試料をアンモニア/メタノールで抽出し、イオン交換系および逆相系の固相カートリッジでクリーンアップした後、メタノールで溶出・定容し、LC/MS/MS-SRM(ESI-positive)で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ソフタゾリン CPB	: 川研ファインケミカルより提供 工業製品（標準品（注 1）として使用）
アンヒトール 20AB	: 花王より提供 工業製品（標準品の値付けに使用）
メタノール	: 関東化学製 残留農薬試験・PCB 試験用（5000 倍濃縮）
28%アンモニア水	: 富士フイルム和光純薬製 試薬特級（底質のみ使用）
精製水	: 比抵抗値 $16\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
酢酸アンモニウム	: 富士フイルム和光純薬製 高速液体クロマトグラフ用
ギ酸	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用（底質のみ使用）
固相カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge 300 mg 80 μm
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis MCX Plus Short Cartridge 225 mg 60 μm （底質のみ使用）

【試薬の調製】

〔28%アンモニア水/メタノール (5:95) 〕

28%アンモニア水 5 mL、メタノール 95 mL を混合する。

〔ギ酸/精製水 (2:98) 〕

ギ酸 2 mL、精製水 98 mL を混合する。

【標準液の調製】

〔標準液〕

ソフタゾリン CPB 15.0 mg を正確に量り取り、メタノールで 10 mL として 1500 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製する。標準原液を適宜メタノールで希釈し、ソフタゾリン CPB として 15 $\mu\text{g/mL}$ 、75 ng/mL 及び 15 ng/mL の標準液を調製する。

各標準液中の各同族体濃度を表 1 に示す。

表 1 各標準液中の各同族体濃度（単位：ng/mL）

標準液	AAPB- C ₁₀	AAPB- C ₁₂	AAPB- C ₁₄	AAPB- C ₁₆	AAPB- C ₁₈ *	AAPB- C ₁₈
15 µg/mL	260	1790	564	174	75.8	36.2
75 ng/mL	1.30	8.93	2.82	0.872	0.379	0.181
15 ng/mL	0.260	1.79	0.564	0.174	0.0758	0.0362

〔検量線用標準液〕

15 ng/mL の標準液をメタノールで適宜希釈し、ソフタゾリン CPB として 1.5~15 ng/mL の検量線用標準液とする。

各検量線用標準液中の各同族体濃度を表 2 に示す。

表 2 各検量線用標準液中の各同族体濃度（単位：ng/mL）

検量線用 標準液	AAPB- C ₁₀	AAPB- C ₁₂	AAPB- C ₁₄	AAPB- C ₁₆	AAPB- C ₁₈ *	AAPB- C ₁₈
15 ng/mL	0.260	1.79	0.564	0.174	0.0758	0.0362
7.5 ng/mL	0.130	0.893	0.282	0.0872	0.0379	0.0181
4.5 ng/mL	0.0779	0.536	0.169	0.0523	0.0227	0.0108
3.0 ng/mL	0.0519	0.357	0.113	0.0349	0.0152	0.00723
1.5 ng/mL	0.0260	0.179	0.0564	0.0174	0.00758	0.00362

【器具】（注 2）（注 3）（注 4）（注 5）

ガラス製リザーバ	: ジーエルサイエンス製ガラス SPE カートリッジ用リザーバ (容量 100 mL*2、50 mL*1、10 mL*1)
ガラス SPE PTFE 接続アダプター*1 注射筒	: ジーエルサイエンス製（10 mL 用） : 10 mL（固相抽出カートリッジのコン ディショニング等を使用）、100 mL*1（PTFE 接続アダプターにより 10 mL ガラス筒に接続、加圧方式に よる溶出に使用）
遠沈管 (プラグシールキャップ付き)*1	: Labcon 製（本体／PP、フタ／PE、 容量 50 mL、15 mL）
ラテックスグローブ	: エブノ製 No.455 パウダーフリー
乾燥機又は湯煎機	: 乾燥機は温度 95°C に設定できるもの、 湯煎機は沸騰を維持できるもの
ホットプレート	: 55°C に設定できるもの
湯浴	: 70°C に設定できるもの
パスツールピペット	

ピペット	: GILSON 製 (チップ/PP)
バイアル	: Agilent 製 (本体/ガラス製、不活性 処理済み、セプタム/PTFE/RS)
ガラス製ねじ口瓶 (PTFE 張りセプタム付き蓋) *2	: SCHOTT/DURAN ねじ口瓶丸型白/ プレミアムキャップ、水質試料採取 瓶
透明摺りメスフラスコ	: 100 mL、10 mL
ホールピペット	: 10 mL、5 mL、3 mL、2 mL、1 mL
遠心分離機*1	: 3000 rpm に設定できるもの
コンセントレータ	: Waters 製 Sep-Pak コンセントレータ ーPlus

*1：底質のみ使用

*2：水質のみ使用

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

[水質]

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)における「試料の採取方法及び検体の調製等」に従う。

採取容器にはガラス製ねじ口瓶 (PTFE 張りセプタム付き蓋) を用い、水質試料 100 mL を採取し、速やかにアセトニトリル 10 mL を添加、冷暗所に保管する。速やかに試験操作を行えない場合は、さらに採取後 2 日以内に加熱処理 (95°C、1 時間) (注 6) した後、冷暗所に保管する。試料採取のみ実施する機関においては、加熱処理までの保存処理を行った後、冷蔵で分析機関に送付する。また、採取した試料は全量を抽出に用いる (注 7)。

[底質]

「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)における「試料の採取方法及び検体の調製等」に従う。

試料容器には 50 mL 遠沈管 (プラグシールキャップ付き) を用い、底質試料約 40 mL を採取した後、速やかに試験操作を行う。速やかに行えない場合は、遠心分離 (3000 rpm、20 分) により間隙水を取り除いた後、加熱処理 (95°C、1 時間) (注 8) を行い、冷暗所に保管する。加熱処理は、採取後 1 日以内、遅くとも 3 日以内に行う。試料採取のみ実施する機関においては、加熱処理までの保存処理を行った後、冷蔵で分析機関に送付する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

〔水質〕

あらかじめメタノール 20 mL 及び精製水 5 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ(Sep-Pak PS2)に 100 mL ガラス製リザーバ（注 9）を接続する。水質試料の全量をリザーバに加え、さらに精製水 5 mL で試料容器を洗い込んだ後、3 mL/min の流量で通水する。通水後、固相抽出カートリッジを精製水 10 mL で洗浄する。次に、試料容器にメタノール 10 mL を加え、蓋を閉め、あらかじめ加熱したホットプレート（注 10）上で 15 分以上加熱し、振とう後、パスツールピペットを用いてリザーバの壁面を洗い込みながらリザーバに加える。再度、試料容器にメタノール 10 mL を加え、同様の操作を繰り返した後、リザーバに精製水 30 mL を加え、軽く振り交ぜ、固相抽出カートリッジに 3 mL/min の流量で通液する。通液後、固相抽出カートリッジに注射筒を接続、約 20 mL の空気を送ることで脱水した後、メタノール 10 mL で溶出する。溶出液を 10 mL メスフラスコに受け、メタノールで 10 mL に定容し、試験液とする。

〔底質〕

底質試料 10 g-dry 相当を 50 mL 遠沈管に分取し、28%アンモニア水/メタノール(5:95) 30 mL を加え、遠沈管のフタを閉め、スラリー状になるよう振り混ぜた後、湯浴に浸漬（70℃, 15 分）する（注 11）。浸漬後、遠心分離（3000 rpm、10 分（3 回目は 20 分））を行い、上澄み液を 100 mL メスフラスコに分取する。同様の抽出操作をさらに 2 回繰り返し、上澄み液を 100 mL メスフラスコに合わせ、メタノールにより 100 mL に定容する。あらかじめ 28%アンモニア水/メタノール(5:95) 20 mL、メタノール 10 mL、精製水 5 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ(Oasis MCX)に 10 mL リザーバ(注 9)を接続する。抽出液 2 mL を 10 mL リザーバに分取し、精製水 3 mL を加え、軽く振り交ぜた後、固相抽出カートリッジに 2 mL/min の流量で通液する。通液後、固相抽出カートリッジを精製水 2 mL、ギ酸/精製水(2:98) 5 mL、メタノール 10 mL で洗浄した後、28%アンモニア水/メタノール (5:95) 10 mL で溶出し、15 mL 遠沈管に受ける。次に、あらかじめメタノール 20 mL 及び精製水 5 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ(Sep-Pak PS2)に 50 mL リザーバ（注 9）を接続する。溶出液の全量をリザーバに加え、さらにメタノール 5 mL により 15 mL 遠沈管を洗い込み、精製水 22.5 mL を加え、軽く振り交ぜた後、固相抽出カートリッジに 2 mL/min の流量で通液する。通液後、固相抽出カートリッジに注射筒を接続、精製水 5 mL で洗浄した後、約 20 mL の空気を送ることで脱水し、メタノール 10 mL で溶出する。溶出液を 10 mL メスフラスコに受け、メタノールで 10 mL に定容し、試験液とする。

【空試験液の調製】

〔水質〕

試料と同じ量の精製水を用い、アセトニトリル 10 mL を添加し、加熱処理を行った後、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

〔底質〕

試料を入れずに加熱処理を行った後【試料の前処理及び試験液の調製】に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕

〔LC 条件〕

使用機種	: Agilent 製 1100 series
使用カラム	: 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm, 3 μm)
リテンションギャップ用カラム	: 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (100 mm × 2.1 mm, 3 μm)
移動相	: A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B : アセトニトリル : 0 → 15 min A:90→10 B:10→90 linear gradient 15 → 30 min A:B = 10:90 30 → 30.1 min A:10→90 B:90→10 linear gradient 30.1 → 45 min A:B = 90:10
流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C
注入量	: 5 μL
ニードル洗浄液	: メタノール

〔MS 条件〕

使用機種	: AB サイエックス製 API3200
イオン化法	: ESI (Positive)
測定モード	: SRM (Selected Reaction Monitoring)
イオンソース	: Curtain Gas : 20 psi Collision Gas : 3 Ion Source Gas 1 : 60 psi Ion Source Gas 2 : 80 psi Ion Spray Voltage : 5500 V Temperature : 600°C
モニターイオン、ドリフト電圧(DP)、 コリジョン電圧(CE)	

: AAPB-C₁₀ m/z 315.3 > 212.2, DP:31 V, CE:23 V
 AAPB-C₁₂ m/z 343.3 > 240.1, DP:31 V, CE:23 V
 AAPB-C₁₄ m/z 371.3 > 268.3, DP:41 V, CE:27 V
 AAPB-C₁₆ m/z 399.4 > 296.2, DP:31 V, CE:33 V
 AAPB-C₁₈ m/z 427.4 > 324.3, DP:46 V, CE:29 V
 AAPB-C₁₈' m/z 425.3 > 322.5, DP:46 V, CE:25 V

〔検量線〕

検量線用標準液 5 μL を LC/MS/MS に注入し、対象物質のピーク面積及び濃度から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 5 μL を LC/MS/MS に注入し、対象物質のピーク面積から対象物質の濃度を求める。

〔濃度の算出〕

〔水質〕

水質試料中の濃度 (ng/L) = 検出濃度 (ng/mL) × 最終液量 (mL) / 試料量 (L)

〔底質〕

底質試料中の濃度 (μg/g-dry) = 検出濃度 (ng/mL) × 最終液量 (mL) / 試料量 (g-dry) × 50*/1000

*：抽出液 100 mL から 2 mL を分取した。

〔装置検出下限値 (IDL) 〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 3-1、3-2 に示す（注 12）。

表 3-1 IDL の算出結果（水質）

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
AAPB-C ₁₀	0.021	0.10	10	0.00042
AAPB-C ₁₂	0.10	0.10	10	0.0021
AAPB-C ₁₄	0.021	0.10	10	0.00043
AAPB-C ₁₆	0.029	0.10	10	0.00058
AAPB-C ₁₈ '	0.0083	0.10	10	0.00017
AAPB-C ₁₈	0.0032	0.10	10	0.000064

表 3-2 IDL の算出結果（底質）

物質名	IDL (pg)	試料量 (g-dry)	分取*	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/g-dry)
AAPB-C ₁₀	0.021	10	1/50	10	0.00021
AAPB-C ₁₂	0.10	10	1/50	10	0.0010
AAPB-C ₁₄	0.021	10	1/50	10	0.00021
AAPB-C ₁₆	0.029	10	1/50	10	0.00029
AAPB-C ₁₈ '	0.0083	10	1/50	10	0.000083
AAPB-C ₁₈	0.0032	10	1/50	10	0.000032

*：底質は 2/100 分取

〔分析方法下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 4-1, 4-2 に示す（注 13）。

表 4-1 MDL 及び MQL 算出の結果（水質）

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
AAPB-C ₁₀	0.10	10	0.0015	0.0040
AAPB-C ₁₂	0.10	10	0.015	0.038
AAPB-C ₁₄	0.10	10	0.0029	0.0074
AAPB-C ₁₆	0.10	10	0.0014	0.0037
AAPB-C ₁₈ '	0.10	10	0.00026	0.00066
AAPB-C ₁₈	0.10	10	0.00014	0.00036

表 4-2 MDL 及び MQL 算出の結果（底質）

物質名	試料量 (g-dry)	分取*	最終液量 (mL)	MDL (μg/g-dry)	MQL (μg/g-dry)
AAPB-C ₁₀	10	1/50	10	0.00064	0.0016
AAPB-C ₁₂	10	1/50	10	0.0026	0.0066
AAPB-C ₁₄	10	1/50	10	0.0010	0.0026
AAPB-C ₁₆	10	1/50	10	0.00033	0.00086
AAPB-C ₁₈ '	10	1/50	10	0.00015	0.00039
AAPB-C ₁₈	10	1/50	10	0.000062	0.00016

*：底質は 2/100 分取

注 解

- (注 1) ソフトゾリン CPB は本分析法において対象とする全ての同族体を含むアルキルアミドプロピルベタインであり、定量 NMR 及び GC-FID によって値付けすることで標準品として使用した。
- (注 2) ここで示す製品は実際に使用した商品を掲げたが、これらを推奨するものではなく、これらと同等以上の品質、性能のものを用いても問題ない。
- (注 3) ガラス製品からは器具ブランクが検出されるため、使用するにあたってはあらかじめ加温したメタノールによる洗浄を十分に行い、ブランクコントロールされていることを確認すること。加温しないメタノールでは、十分にブランクが低減しない。一方、プラスチック製品は、ブランクコントロールに優れており、器具ブランクが検出されなかったため、洗浄せず使用した。なお、素手からもブランクが検出されるため、すべての操作はラテックス製手袋を着用して行う。
- (注 4) JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。
- (注 5) マイクロシリンジ及びマイクロピペットを使用する場合には精度管理ないしバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注 6) 乾燥機を用い、ガラス製ねじ口瓶の蓋を閉め、密閉状態で加熱する。また、加熱処理には湯煎機を用いてよく、密閉状態のガラス製ねじ口瓶を沸騰状態で 0.5 時間浸漬する。
- (注 7) 試料量は、試料採取前と採取後の試料容器重量、アセトニトリルの添加量(7.8 g)から換算する。
- (注 8) 乾燥機を用い、遠沈管（プラグシールキャップ付き）の蓋を閉め、密閉状態で加熱する。また、加熱処理には湯煎機を用いてよく、密閉状態の遠沈管を沸騰状態で 0.5 時間浸漬する。
- (注 9) ブランクコントロールのため擦り付きの注射筒は使用しない。
- (注 10) ガラス製ねじ口瓶の蓋を閉め、密閉状態で約 55°C に加熱する。あらかじめ精製水を加えたビーカーをホットプレートに置き、水温が約 55°C になるよう温度設定しておく。
- (注 11) 浸漬後 7 分半を目安に、遠沈管を一旦湯浴から取り出し、室温で一分程度放置した後、手早く振とうする。再び湯浴に 7 分半浸漬した後、再度、同様に振とうする。室温で放置することなく振とうすると内容物が吹きこぼれるおそれがある。

(注 12) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に準じて算出した。算出結果を表 5-1～5-4 示す。また図 1-1、1-2 に IDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 5-1 IDL の算出結果 (詳細) (水質)

対象物質名	AAPB-C ₁₀	AAPB-C ₁₂	AAPB-C ₁₄
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.026	0.18	0.056
注入量 (pg)	0.13	0.90	0.28
装置注入液量 (μL)	5.0	5.0	5.0
結果 1 (pg)	0.136	0.940	0.292
結果 2 (pg)	0.124	0.895	0.286
結果 3 (pg)	0.130	0.910	0.285
結果 4 (pg)	0.135	0.955	0.290
結果 5 (pg)	0.122	0.910	0.277
結果 6 (pg)	0.128	0.875	0.281
結果 7 (pg)	0.133	0.920	0.290
平均値 (pg)	0.1296	0.9150	0.2856
標準偏差 (σ _{n-1}) (pg)	0.00547	0.0268	0.00548
IDL (pg)*	0.021	0.10	0.021
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.42	2.1	0.43
S/N 比	170	210	160
CV (%)	4.2	2.9	1.9

* : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

表 5-2 IDL の算出結果（詳細）（水質）

対象物質名	AAPB-C ₁₆	AAPB-C ₁₈ *	AAPB-C ₁₈
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.017	0.0076	0.0036
注入量 (pg)	0.087	0.038	0.018
装置注入液量 (μL)	5.0	5.0	5.0
結果 1 (pg)	0.0935	0.0333	0.0178
結果 2 (pg)	0.0940	0.0344	0.0174
結果 3 (pg)	0.0985	0.0381	0.0175
結果 4 (pg)	0.0900	0.0352	0.0179
結果 5 (pg)	0.0845	0.0379	0.0159
結果 6 (pg)	0.0780	0.0356	0.0186
結果 7 (pg)	0.0815	0.0391	0.0175
平均値 (pg)	0.08857	0.03621	0.01749
標準偏差 (σ _{n-1}) (pg)	0.00745	0.00214	0.000821
IDL (pg)*	0.029	0.0083	0.0032
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.58	0.17	0.064
S/N 比	150	25	43
CV (%)	8.4	5.9	4.7

* : IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

表 5-3 IDL の算出結果（詳細）（底質）

対象物質名	AAPB-C ₁₀	AAPB-C ₁₂	AAPB-C ₁₄
試料量 (g-dry)	10	10	10
分取 ^{*1}	1/50	1/50	1/50
最終液量 (mL)	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.026	0.18	0.056
注入量 (pg)	0.13	0.90	0.28
装置注入液量 (μL)	5.0	5.0	5.0
結果 1 (pg)	0.136	0.940	0.292
結果 2 (pg)	0.124	0.895	0.286
結果 3 (pg)	0.130	0.910	0.285
結果 4 (pg)	0.135	0.955	0.290
結果 5 (pg)	0.122	0.910	0.277
結果 6 (pg)	0.128	0.875	0.281
結果 7 (pg)	0.133	0.920	0.290
平均値 (pg)	0.1296	0.9150	0.2856
標準偏差 (σ _{n-1}) (pg)	0.00547	0.0268	0.00548
IDL (pg) ^{*2}	0.021	0.10	0.021
IDL 試料換算値 (ng/g-dry)	0.21	1.0	0.21
S/N 比	170	210	160
CV (%)	4.2	2.9	1.9

*1 : 底質は 2/100 分取

*2 : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

表 5-4 IDL の算出結果（詳細）（底質）

対象物質名	AAPB-C ₁₆	AAPB-C ₁₈ *	AAPB-C ₁₈
試料量 (g-dry)	10	10	10
分取 ^{*1}	1/50	1/50	1/50
最終液量 (mL)	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.017	0.0076	0.0036
注入量 (pg)	0.087	0.038	0.018
装置注入液量 (μL)	5.0	5.0	5.0
結果 1 (pg)	0.0935	0.0333	0.0178
結果 2 (pg)	0.0940	0.0344	0.0174
結果 3 (pg)	0.0985	0.0381	0.0175
結果 4 (pg)	0.0900	0.0352	0.0179
結果 5 (pg)	0.0845	0.0379	0.0159
結果 6 (pg)	0.0780	0.0356	0.0186
結果 7 (pg)	0.0815	0.0391	0.0175
平均値 (pg)	0.08857	0.03621	0.01749
標準偏差 (σ _{n-1}) (pg)	0.00745	0.00214	0.000821
IDL (pg)*	0.029	0.0083	0.0032
IDL 試料換算値 (ng/g-dry)	0.29	0.083	0.032
S/N 比	150	25	43
CV (%)	8.4	5.9	4.7

*1 : 底質は 2/100 分取

*2 : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

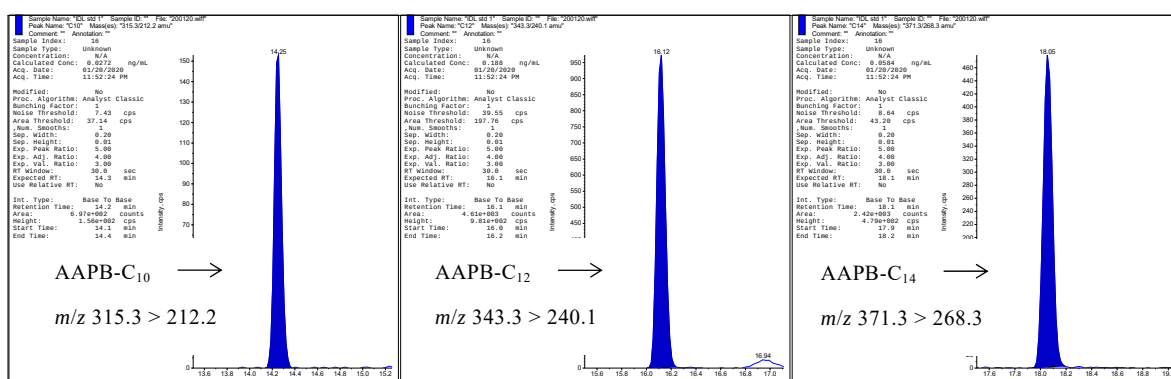


図 1-1 IDL 測定時のクロマトグラム（検量線用標準液 1.5 ng/mL）
 （AAPB-C₁₀ 0.026 ng/mL（左図）、AAPB-C₁₂ 0.18 ng/mL（中図）、AAPB-C₁₄ 0.056 ng/mL（右図））

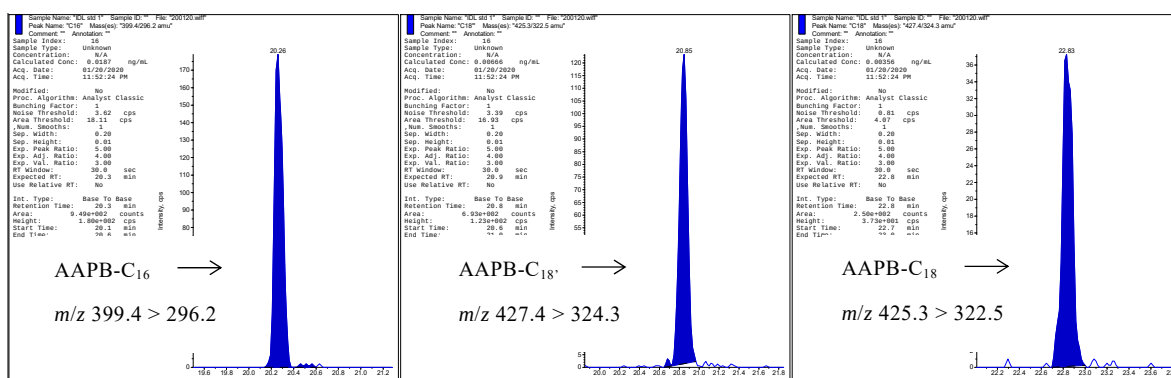


図 1-2 IDL 測定時のクロマトグラム（検量線用標準液 1.5 ng/mL）
 （AAPB-C₁₆ 0.017 ng/mL（左図）、AAPB-C_{18'} 0.0076 ng/mL（中図）、AAPB-C₁₈ 0.0036 ng/mL（右図））

(注 13) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に準じて算出した。算出結果を表 6-1～6-4 に示す。また 図 2-1～2-4 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 6-1 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) (水質)

対象物質名	AAPB-C ₁₀	回収率 (%)	AAPB-C ₁₂	回収率 (%)	AAPB-C ₁₄	回収率 (%)
試料	河川水		河川水		河川水	
試料量 (L)	0.10		0.10		0.10	
標準添加量 (ng)	1.3		8.9		2.8	
試料換算濃度 (ng/L)	13		89		28	
最終液量 (mL)	10		10		10	
注入液濃度 (ng/mL)	0.13		0.89		0.28	
装置注入液量 (μL)	5.0		5.0		5.0	
操作ブランク平均 (ng/L) * ¹	<1.5 -		<15 (1.68)		<2.9 (0.386)	
無添加平均 (ng/L) * ²	<1.5 -		<15 (1.54)		<2.9 (0.224)	
結果 1 (ng/L)	12.6	97	85.7	96	27.2	96
結果 2 (ng/L)	12.3	95	85.8	96	28.4	101
結果 3 (ng/L)	12.2	94	87.7	98	28.7	102
結果 4 (ng/L)	12.9	99	95.2	107	29.6	105
結果 5 (ng/L)	13.2	102	94.1	105	29.1	103
結果 6 (ng/L)	13.0	100	90.6	101	28.7	102
結果 7 (ng/L)	13.1	101	88.6	99	28.5	101
平均値 (ng/L)	12.76	98.1	89.67	100	28.60	101
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/L)	0.395		3.80		0.739	
MDL (ng/L) * ³	1.5		15		2.9	
MQL (ng/L) * ⁴	4.0		38		7.4	
S/N 比	470		1200		680	
CV (%)	3.1		4.2		2.6	

*1 : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*2 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 2)

*3 : MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 : MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

表 6-2 MDL 及び MQL の算出結果（詳細）（水質）

対象物質名	AAPB-C ₁₆	回収率 (%)	AAPB-C ₁₈ *	回収率 (%)	AAPB-C ₁₈	回収率 (%)
試料	河川水		河川水		河川水	
試料量 (L)	0.10		0.10		0.10	
標準添加量 (ng)	0.87		0.38		0.18	
試料換算濃度 (ng/L)	8.7		3.8		1.8	
最終液量 (mL)	10		10		10	
注入液濃度 (ng/mL)	0.087		0.038		0.018	
装置注入液量 (μL)	5.0		5.0		5.0	
操作ブランク平均 (ng/L) * ¹	<1.4 (0.285)		<0.26 (0.0812)		<0.14 (0.0499)	
無添加平均 (ng/L) * ²	<1.4 (0.255)		<0.26 (0.0709)		<0.14 (0.0894)	
結果 1 (ng/L)	7.76	89	3.60	95	1.69	93
結果 2 (ng/L)	8.80	101	3.61	95	1.64	91
結果 3 (ng/L)	8.80	101	3.57	94	1.60	88
結果 4 (ng/L)	8.75	100	3.65	96	1.68	93
結果 5 (ng/L)	8.68	100	3.75	99	1.71	94
結果 6 (ng/L)	8.57	98	3.68	97	1.67	92
結果 7 (ng/L)	8.72	100	3.72	98	1.65	91
平均値 (ng/L)	8.583	98.4	3.654	96.4	1.663	91.9
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/L)	0.371		0.0660		0.0364	
MDL (ng/L) * ³	1.4		0.26		0.14	
MQL (ng/L) * ⁴	3.7		0.66		0.36	
S/N 比	240		110		220	
CV (%)	4.3		1.8		2.2	

*1 : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*2 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 2)

*3 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ *4 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

表 6-3 MDL 及び MQL の算出結果（詳細）（底質）

対象物質名	AAPB-C ₁₀	回収率 (%)	AAPB-C ₁₂	回収率 (%)	AAPB-C ₁₄	回収率 (%)
試料	底質		底質		底質	
試料量 (g-dry)	10		10		10	
分取	1/50		1/50		1/50	
標準添加量 (ng)	65		450		140	
試料換算濃度 (ng/g-dry)	6.5		45		14	
最終液量 (mL)	10		10		10	
注入液濃度 (ng/mL) * ¹	0.130		0.893		0.282	
装置注入液量 (μL)	5.0		5.0		5.0	
操作ブランク平均 (ng/g-dry) * ¹	<0.64		<2.6 (0.476)		<1.0 (0.0970)	
無添加平均 (ng/g-dry) * ²	<0.64		<2.6 (1.05)		<1.0 (0.159)	
結果 1 (ng/g-dry)	5.45	84	41.9	94	11.5	81
結果 2 (ng/g-dry)	5.55	85	42.1	94	11.4	81
結果 3 (ng/g-dry)	5.73	88	42.7	96	11.7	83
結果 4 (ng/g-dry)	5.45	84	41.8	94	11.3	80
結果 5 (ng/g-dry)	5.65	87	43.4	97	11.7	83
結果 6 (ng/g-dry)	5.88	90	43.3	97	12.1	86
結果 7 (ng/g-dry)	5.78	89	42.2	94	11.7	83
平均値 (ng/g-dry)	5.639	86.8	42.46	95.1	11.61	82.4
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/g-dry)	0.164		0.659		0.265	
MDL (ng/g-dry) * ³	0.64		2.6		1.0	
MQL (ng/g-dry) * ⁴	1.6		6.6		2.6	
S/N 比	330		1100		650	
CV (%)	2.9		1.6		2.3	

*¹ : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)*² : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 2)*³ : MDL = t (n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2*⁴ : MQL = σ_{n-1} × 10

表 6-4 MDL 及び MQL の算出結果（詳細）（底質）

対象物質名	AAPB-C ₁₆	回収率 (%)	AAPB-C ₁₈	回収率 (%)	AAPB-C ₁₈	回収率 (%)
試料	底質		底質		底質	
試料量 (g-dry)	10		10		10	
分取	1/50		1/50		1/50	
標準添加量 (ng)	44		19		9.1	
試料換算濃度 (ng/g-dry)	4.4		1.9		0.91	
最終液量 (mL)	10		10		10	
注入液濃度 (ng/mL) * ¹	0.0872		0.0379		0.0181	
装置注入液量 (μL)	5.0		5.0		5.0	
操作ブランク平均 (ng/g-dry) * ¹	<0.33 -		<0.15 -		<0.062 (0.0210)	
無添加平均 (ng/g-dry) * ²	<0.33 (0.109)		<0.15 (0.00825)		<0.062 (0.0553)	
結果 1 (ng/g-dry)	3.83	88	1.61	85	0.833	92
結果 2 (ng/g-dry)	3.89	89	1.62	85	0.825	91
結果 3 (ng/g-dry)	3.84	88	1.69	89	0.848	94
結果 4 (ng/g-dry)	4.07	93	1.56	82	0.820	91
結果 5 (ng/g-dry)	3.88	89	1.63	86	0.798	88
結果 6 (ng/g-dry)	3.98	91	1.63	86	0.815	90
結果 7 (ng/g-dry)	3.98	91	1.60	84	0.835	92
平均値 (ng/g-dry)	3.924	90.0	1.617	85.3	0.8246	91.1
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/g-dry)	0.0860		0.0393		0.0160	
MDL (ng/g-dry) * ³	0.33		0.15		0.062	
MQL (ng/g-dry) * ⁴	0.86		0.39		0.16	
S/N 比	90		45		80	
CV (%)	2.2		2.4		1.9	

*1：空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*2：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n=2)

*3：MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ *4：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

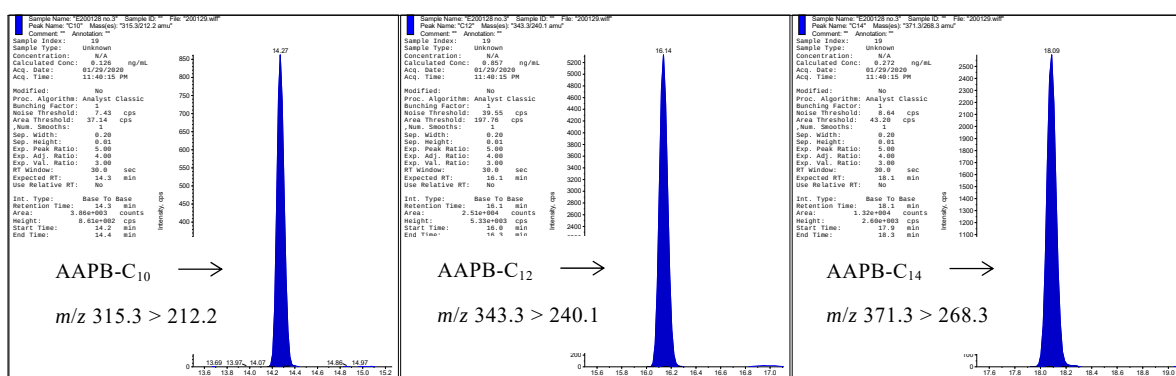


図 2-1 MDL 測定時のクロマトグラム（水質）
（AAPB-C₁₀（左図）、 AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図））

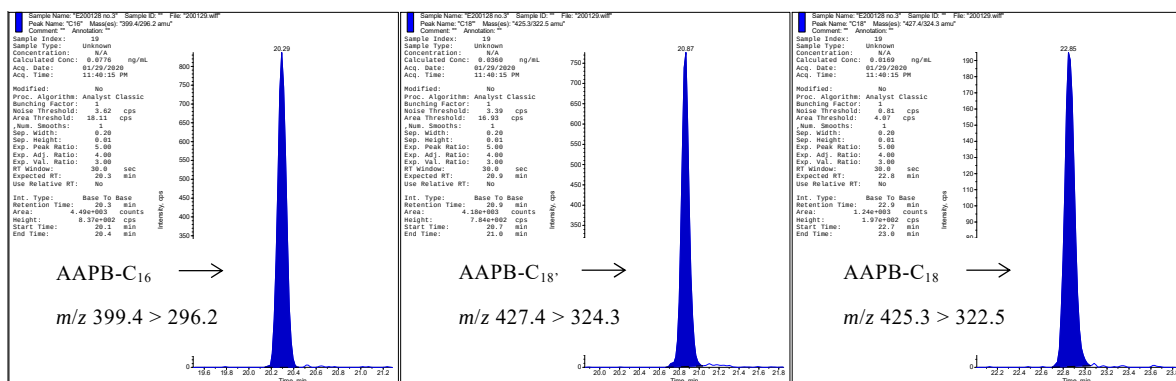


図 2-2 MDL 測定時のクロマトグラム（水質）
（AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C_{18'}（中図）、 AAPB-C₁₈（右図））

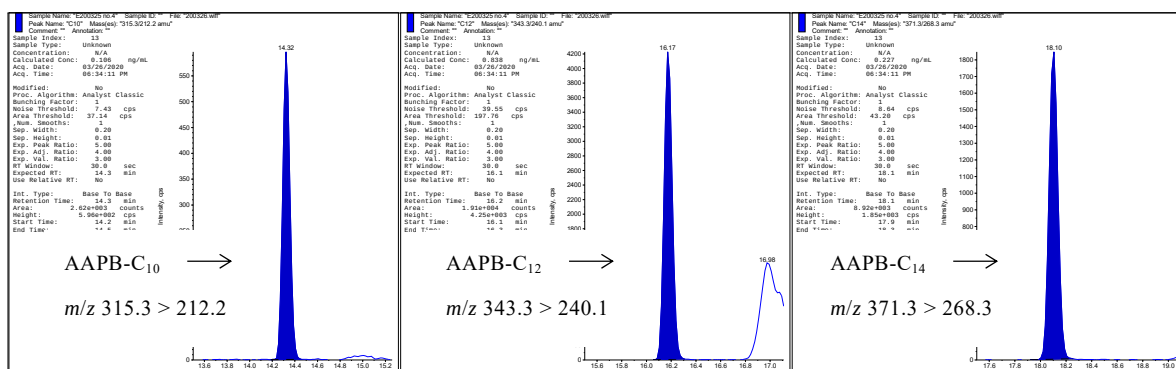


図 2-3 MDL 測定時のクロマトグラム（底質）
（AAPB-C₁₀（左図）、AAPB-C₁₂（中図）、AAPB-C₁₄（右図））

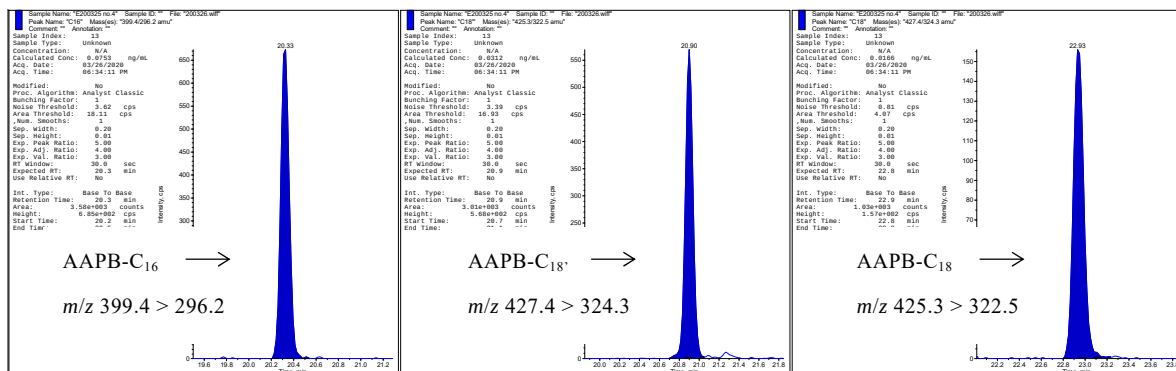


図 2-4 MDL 測定時のクロマトグラム（底質）
（AAPB-C₁₆（左図）、AAPB-C_{18'}（中図）、AAPB-C₁₈（右図））

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図 3-1、3-2 に示す。

〔水質〕

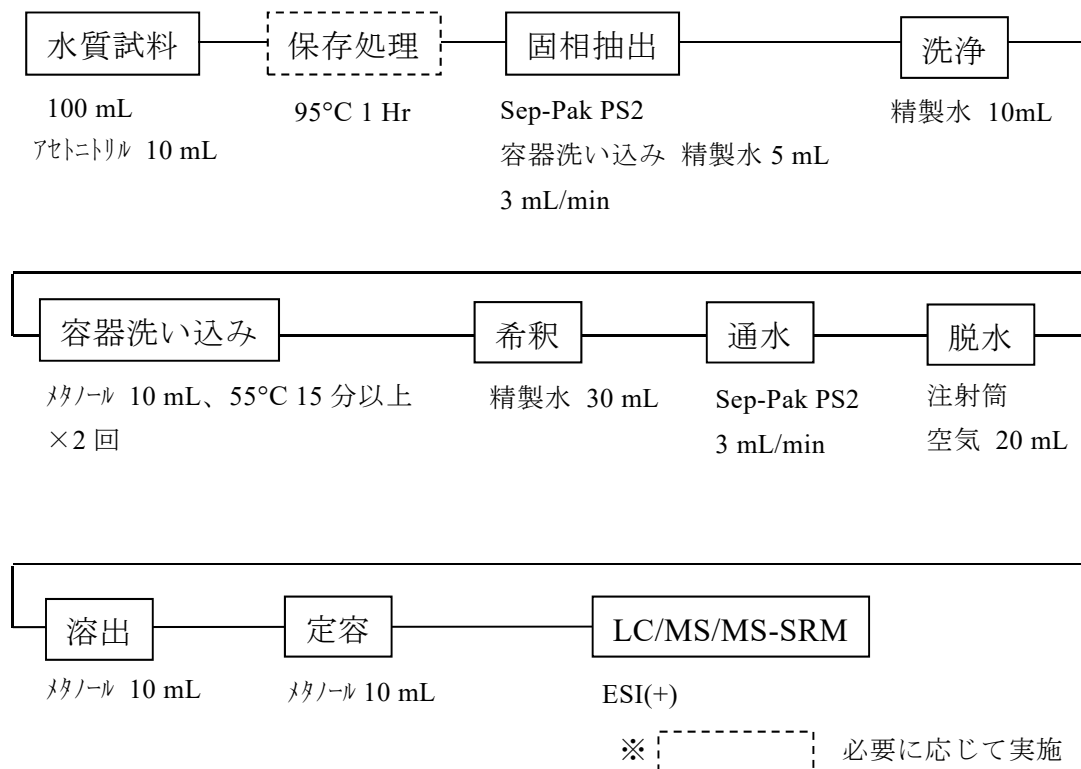


図 3-1 分析法のフローチャート（水質）

[底質]

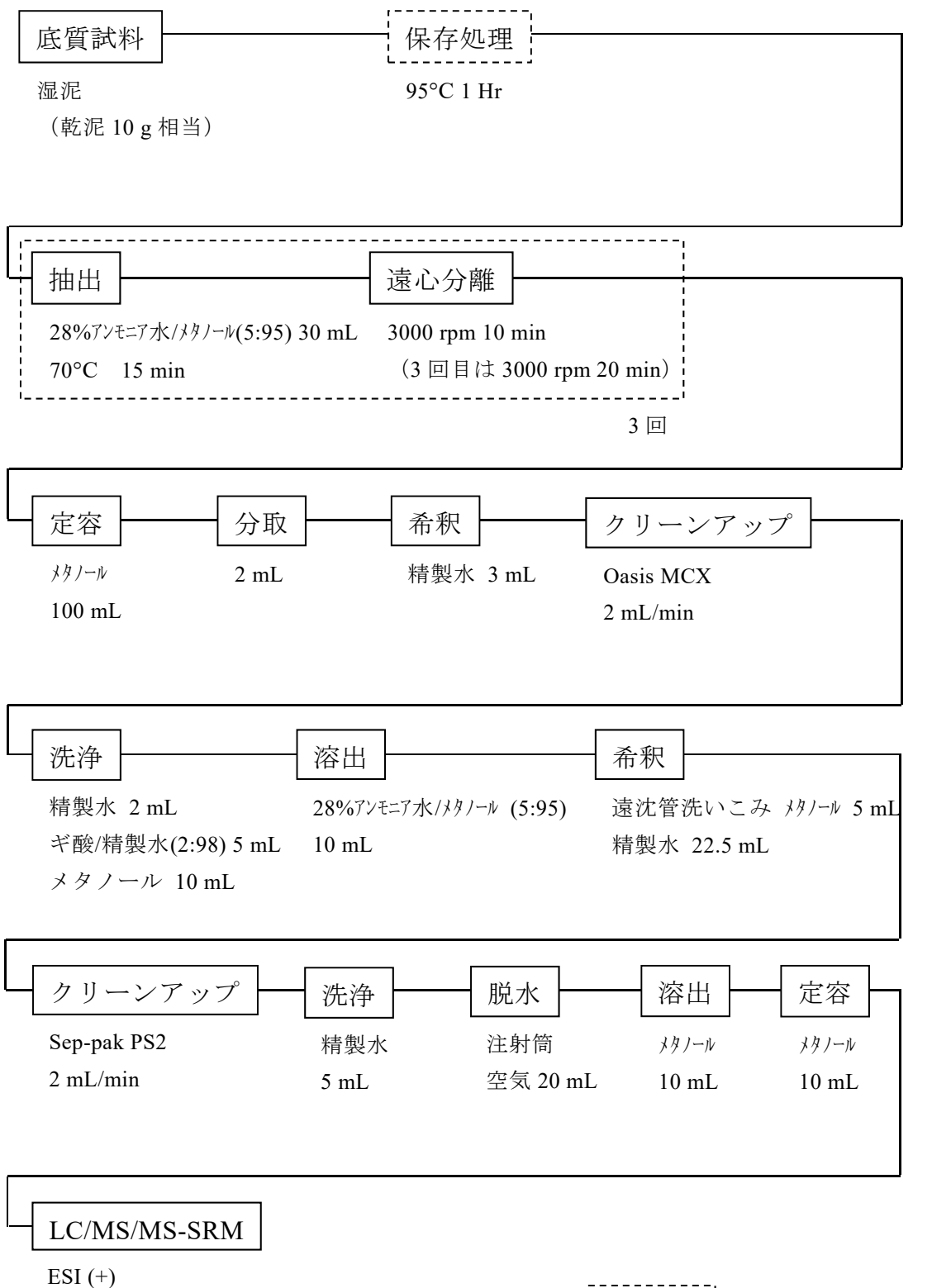


図 3-2 分析法のフローチャート (底質)

〔検量線〕

検量線を図 4-1、4-2 に、検量線作成データを表 7-1～7-3 に示す。

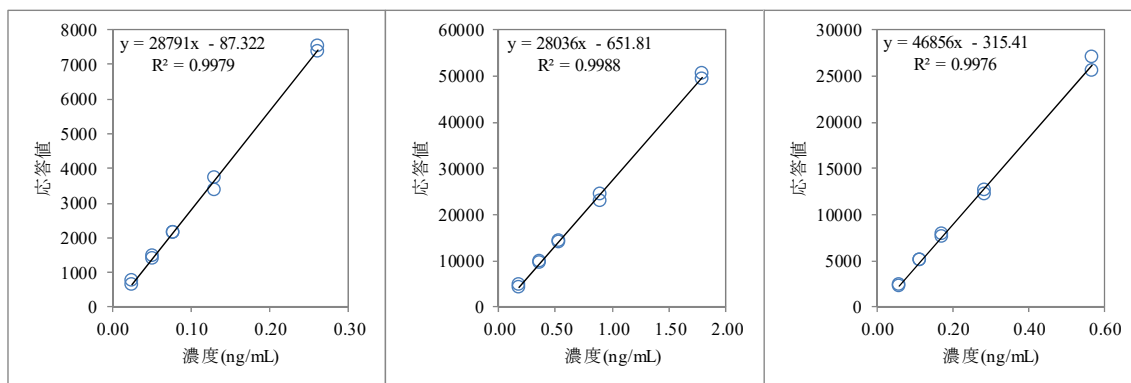


図 4-1 AAPB の検量線

(AAPB-C₁₀ 0.0260～0.260 ng/mL (左図)、 AAPB-C₁₂ 0.179～1.79 ng/mL (中図)、 AAPB-C₁₄ 0.0564～0.564 ng/mL (右図))

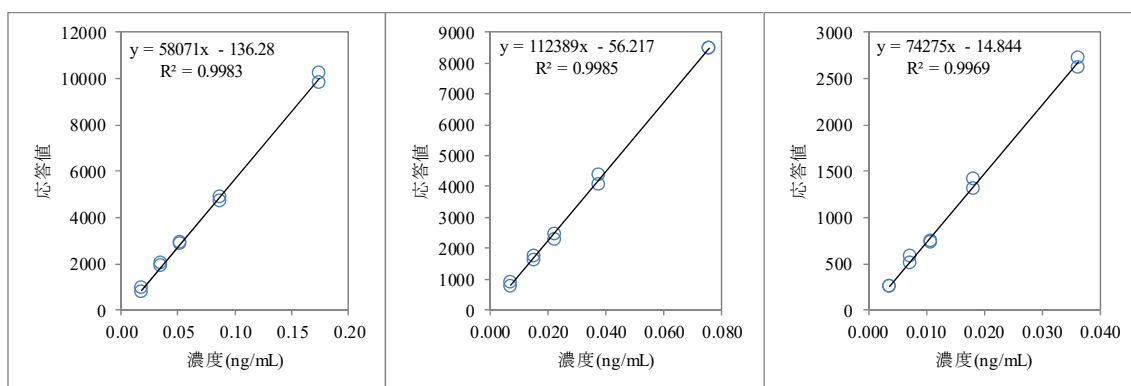


図 4-2 AAPB の検量線

(AAPB-C₁₆ 0.0174～0.174 ng/mL (左図)、 AAPB-C_{18'} 0.00758～0.0758 ng/mL (中図)、 AAPB-C₁₈ 0.00362～0.0362 ng/mL (右図))

表 7-1 AAPB 検量線作成用データ

AAPB-C ₁₀	応答値	AAPB-C ₁₂	応答値
(ng/mL)	(<i>m/z</i> 315.3 > 212.2)	(ng/mL)	(<i>m/z</i> 343.3 > 240.1)
0.0260	749	0.179	4705
0.0260	637	0.179	4316
0.0519	1490	0.357	9764
0.0519	1390	0.357	9635
0.0779	2144	0.536	14469
0.0779	2154	0.536	14141
0.130	3722	0.893	24289
0.130	3376	0.893	23067
0.260	7525	1.79	50418
0.260	7357	1.79	49230

表 7-2 AAPB 検量線作成用データ

AAPB-C ₁₄	応答値	AAPB-C ₁₆	応答値
(ng/mL)	(<i>m/z</i> 371.3 > 268.3)	(ng/mL)	(<i>m/z</i> 399.4 > 296.2)
0.0564	2487	0.0174	945
0.0564	2310	0.0174	780
0.113	5093	0.0349	1931
0.113	5026	0.0349	2036
0.169	7882	0.0523	2863
0.169	7594	0.0523	2952
0.282	12669	0.0872	4889
0.282	12237	0.0872	4691
0.564	26995	0.174	10210
0.564	25546	0.174	9825

表 7-3 AAPB 検量線作成用データ

AAPB-C ₁₈ (ng/mL)	応答値 (<i>m/z</i> 425.3 > 322.5)	AAPB-C ₁₈ (ng/mL)	応答値 (<i>m/z</i> 427.4 > 324.3)
0.00758	895	0.00362	250
0.00758	791	0.00362	257
0.0152	1757	0.00723	590
0.0152	1610	0.00723	508
0.0227	2460	0.0108	740
0.0227	2298	0.0108	725
0.0379	4379	0.0181	1412
0.0379	4082	0.0181	1317
0.0758	8463	0.0362	2620
0.0758	8483	0.0362	2715

〔クロマトグラム〕

検量線用標準液のクロマトグラムを図 5-1、5-2 に示す。

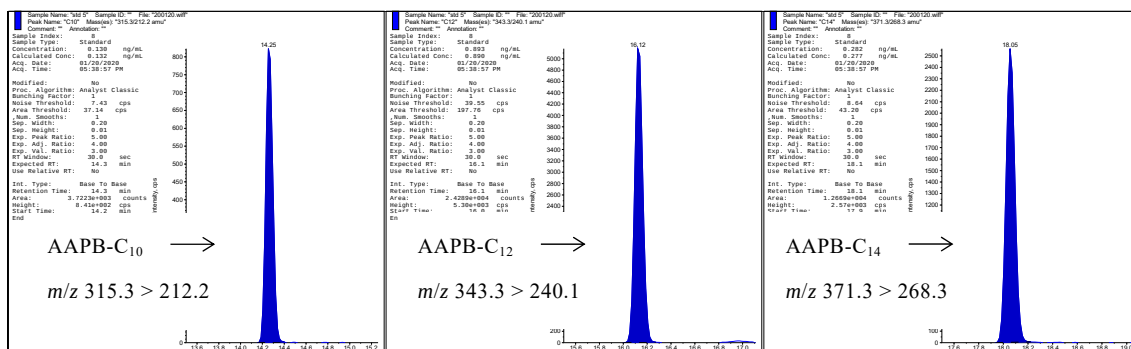


図 5-1 検量線用標準液 (7.5 ng/mL) のクロマトグラム
(AAPB-C10 0.13 ng/mL (左図)、 AAPB-C12 0.89 ng/mL (中図)、
AAPB-C14 0.28 ng/mL (右図))

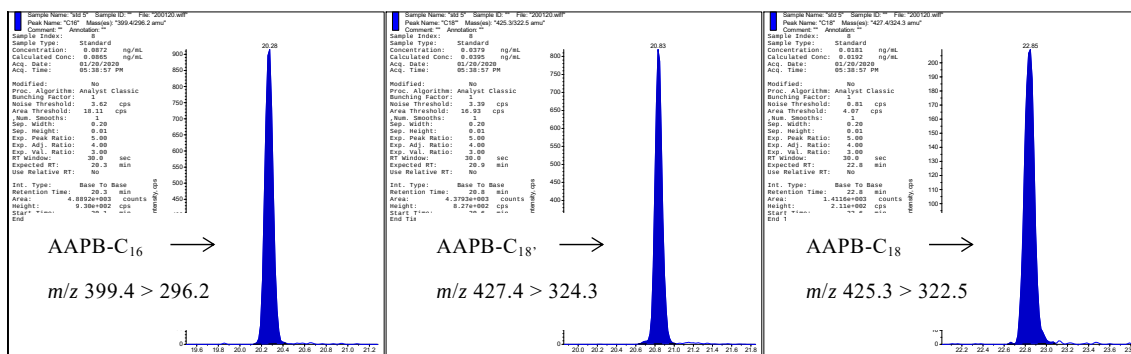


図 5-2 検量線用標準液(7.5 ng/mL)のクロマトグラム
(AAPB-C16 0.087 ng/mL (左図)、 AAPB-C18' 0.038 ng/mL (中図)、 AAPB-C18
0.018 ng/mL (右図))

〔マススペクトル〕

対象物質のマススペクトルを図 6-1～6-6 に示す。

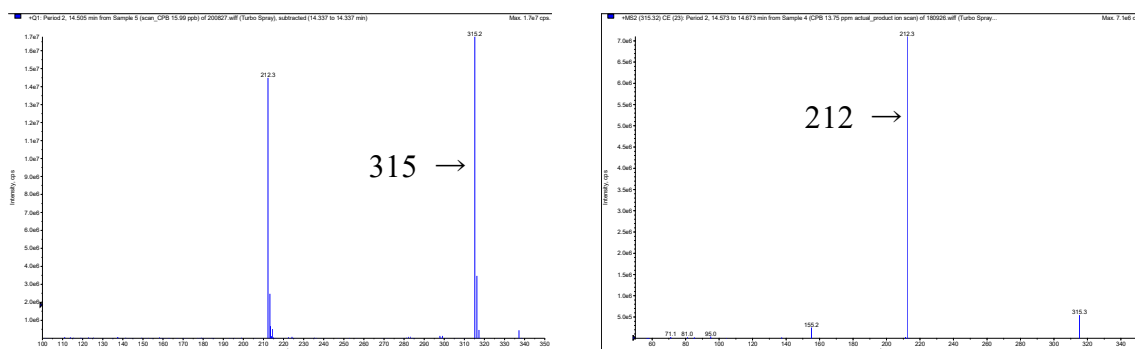


図 6-1 AAPB-C10

(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 315 に対する
プロダクトイオン (CE 23 V) (右図))

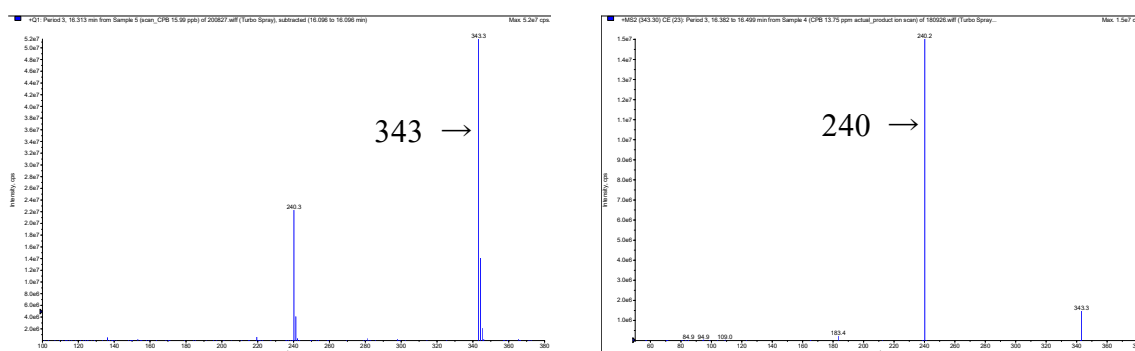


図 6-2 AAPB-C12

(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 343 に対する
プロダクトイオン (CE 23 V) (右図))

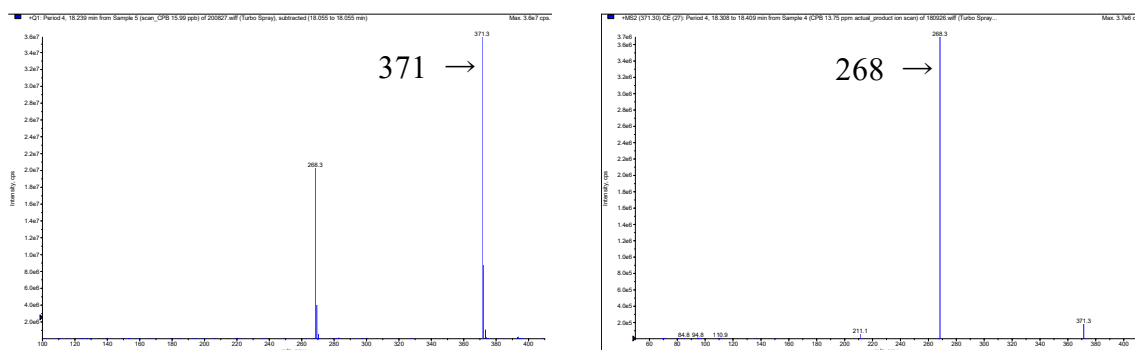


図 6-3 AAPB-C14

(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 371 に対する
プロダクトイオン(CE 27 V) (右図))

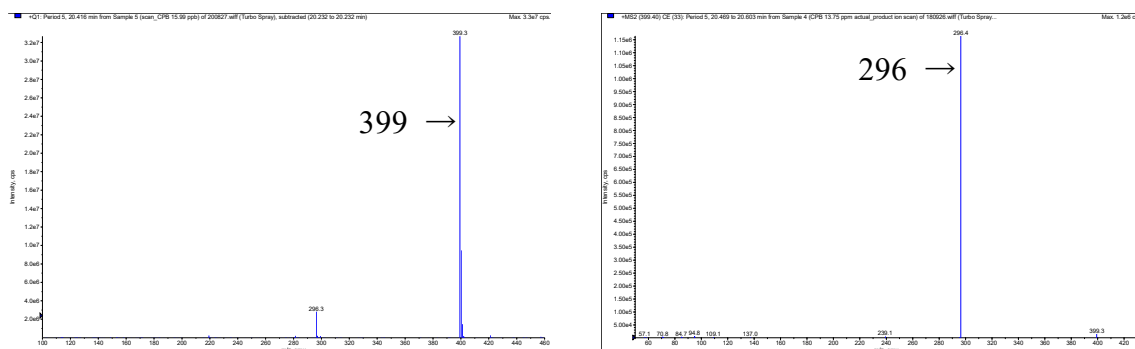


図 6-4 AAPB-C₁₆
(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 399 に対する
プロダクトイオン (CE 33V) (右図))

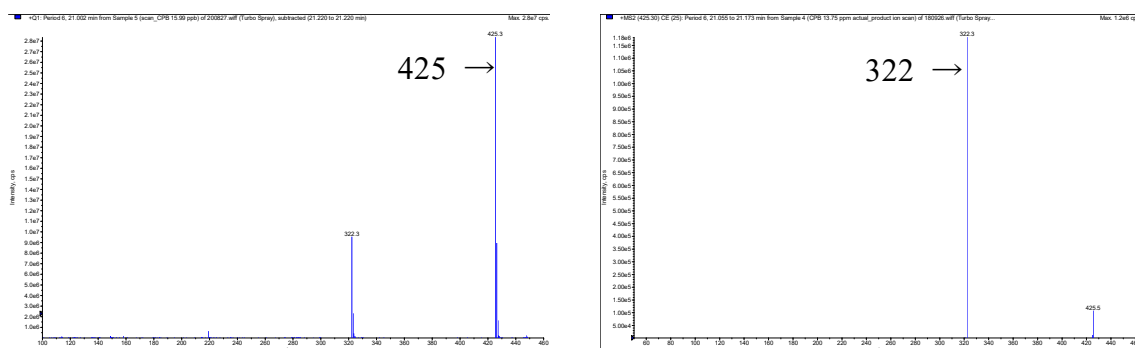


図 6-5 AAPB-C₁₈
(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 425 に対する
プロダクトイオン (CE 25V) (右図))

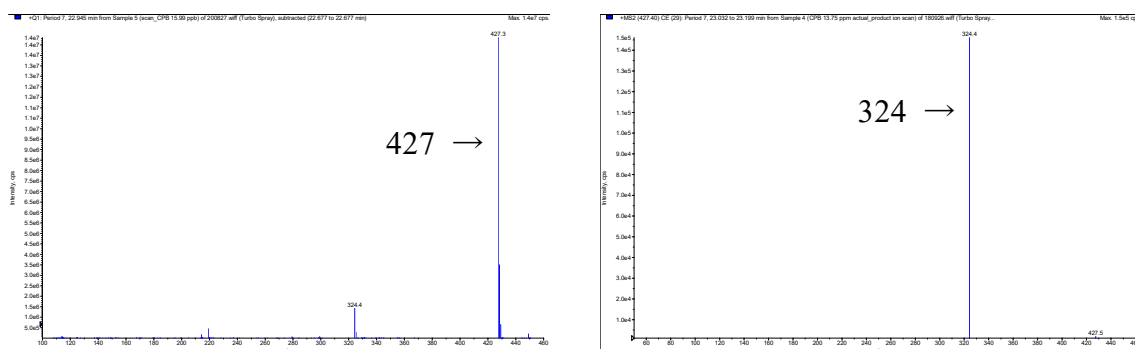


図 6-6 AAPB-C₁₈
(プレカーサーイオン (左図)、プレカーサーイオン m/z 427 に対する
プロダクトイオン (CE 29V) (右図))

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 7-1～7-4 に示す。操作ブランク値は全ての同族体において MDL 未満である。

アルキルアミドプロピルベタインの主成分である AAPB-C₁₂ が装置ブランクとして検出されるため、リテンションギャップ法を採用し、これを回避した。また、ガラス器具からは器具ブランクが検出され、この低減には加温したメタノールによる洗浄が効果的であった。ガラス製ねじ口瓶、メスフラスコについては、口元についても入念に洗浄した。アルキルアミドプロピルベタインは日用製品として使用されており、素手から検出されるため、ラテックスグローブ等を着用した。上記対策の実施により、操作ブランク値は安定し、MDL 未満にコントロールされた。

〔水質〕

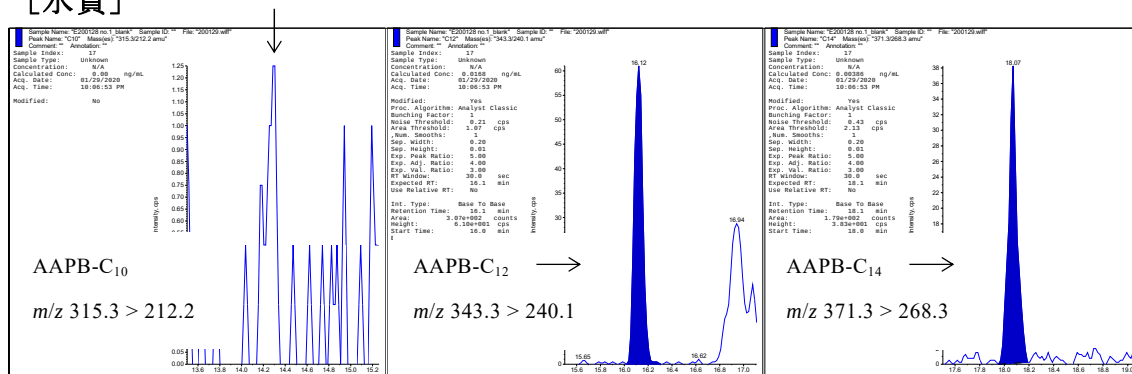


図 7-1 操作ブランク試験のクロマトグラム（水質）
（AAPB-C₁₀（左図）、AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図））

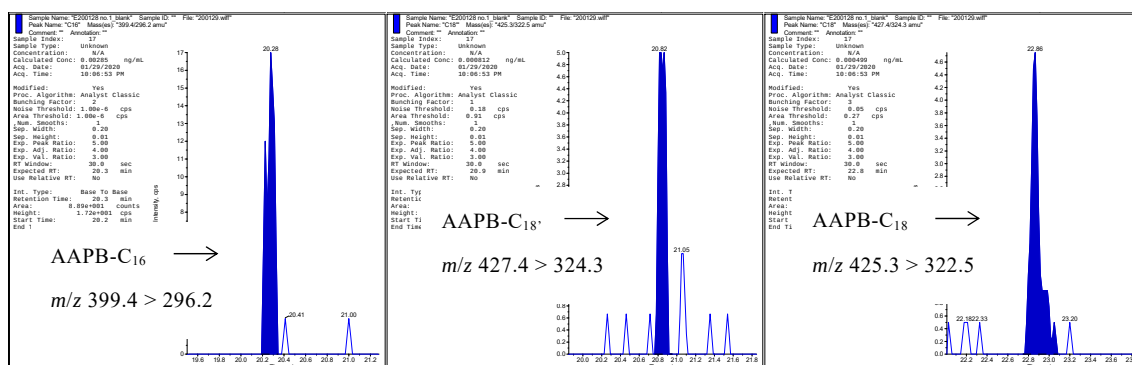


図 7-2 操作ブランク試験のクロマトグラム（水質）
（AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C₁₈（中図）、 AAPB-C₁₈（右図））

[底質]

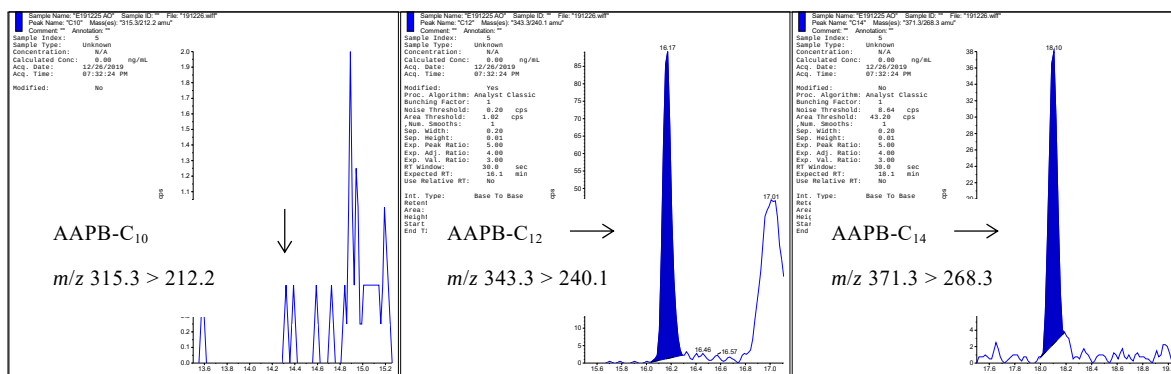


図 7-3 操作ブランク試験のクロマトグラム（底質）
（AAPB-C10（左図）、 AAPB-C12（中図）、 AAPB-C14（右図））

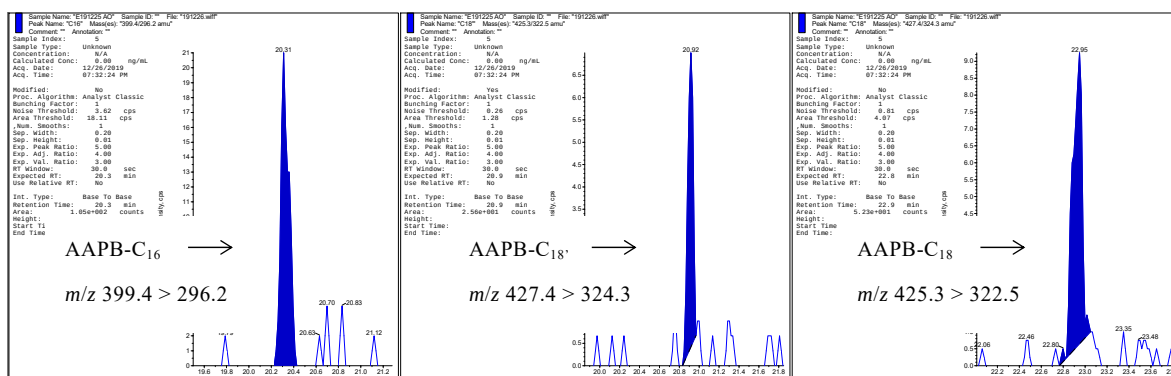


図 7-4 操作ブランク試験のクロマトグラム（底質）
（AAPB-C16（左図）、 AAPB-C18'（中図）、 AAPB-C18（右図））

〔添加回収試験〕

〔水質〕

河川水（紀の川）及び海水（和歌山下津港）への添加回収試験の結果を表 8-1～8-6、また測定時のクロマトグラムを図 8-1～8-8 に示す。

その結果、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って水質試料（河川水）に標準液を添加後、1 時間静置すると、AAPB-C₁₄, AAPB-C₁₆, AAPB-C₁₈*, AAPB-C₁₈ で十分な回収率が得られなかった。一方、水質試料に標準液及びアセトニトリルを添加後、1 時間静置すると十分な回収率が得られた。

この結果をふまえ、本分析法の【試料の採取及び保存】では水質試料の採取直後にアセトニトリルを添加する方法を採用した。

表 8-1 添加回収試験結果(AAPB-C₁₀)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水* ¹	1	0.0	0.10	< 1.5	-	-
	7	1.30	0.10	12.0	92	3.1
河川水* ²	1	0.0	0.10	< 1.5	-	-
	7	1.30	0.10	12.8	98	3.1
海水* ²	2	0.0	0.10	< 1.5	-	-
	5	1.30	0.10	12.3	95	2.3

*1：水質試料に標準液を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準液及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

表 8-2 添加回収試験結果(AAPB-C₁₂)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水 ^{*1}	1	0.0	0.10	< 15	-	-
	7	8.93	0.10	73.6	82	3.0
河川水 ^{*2}	1	0.0	0.10	< 15	-	-
	7	8.93	0.10	89.7	100	4.2
海水 ^{*2}	2	0.0	0.10	< 15	-	-
	5	8.93	0.10	90.9	102	3.0

*1：水質試料に標準を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

表 8-3 添加回収試験結果(AAPB-C₁₄)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水 ^{*1}	1	0.0	0.10	< 2.9	-	-
	7	2.82	0.10	16.5	58	4.8
河川水 ^{*2}	1	0.0	0.10	< 2.9	-	-
	7	2.82	0.10	28.6	101	2.6
海水 ^{*2}	2	0.0	0.10	< 2.9	-	-
	5	2.82	0.10	28.9	103	1.9

*1：水質試料に標準を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

表 8-4 添加回収試験結果(AAPB-C₁₆)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水 ^{*1}	1	0.0	0.10	< 1.4	-	-
	7	0.872	0.10	4.98	57	12
河川水 ^{*2}	1	0.0	0.10	< 1.4	-	-
	7	0.872	0.10	8.58	98	4.3
海水 ^{*2}	2	0.0	0.10	< 1.4	-	-
	5	0.872	0.10	9.20	106	5.5

*1：水質試料に標準を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

表 8-5 添加回収試験結果(AAPB-C₁₈)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水 ^{*1}	1	0.0	0.10	< 0.26	-	-
	7	0.379	0.10	2.31	61	11
河川水 ^{*2}	1	0.0	0.10	< 0.26	-	-
	7	0.379	0.10	3.65	96	1.8
海水 ^{*2}	2	0.0	0.10	< 0.26	-	-
	5	0.379	0.10	3.67	97	2.2

*1：水質試料に標準を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

表 8-6 添加回収試験結果(AAPB-C₁₈)

水質試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
河川水 ^{*1}	1	0.0	0.10	< 0.14	-	-
	7	0.181	0.10	1.22	67	9.4
河川水 ^{*2}	1	0.0	0.10	< 0.14	-	-
	7	0.181	0.10	1.66	92	2.2
海水 ^{*2}	2	0.0	0.10	< 0.14	-	-
	5	0.181	0.10	1.86	103	3.1

*1：水質試料に標準を添加、1 時間静置後、保存処理及び前処理を実施

*2：水質試料に標準及びアセトニトリルを添加、1 時間静置後、加熱処理及び前処理を実施

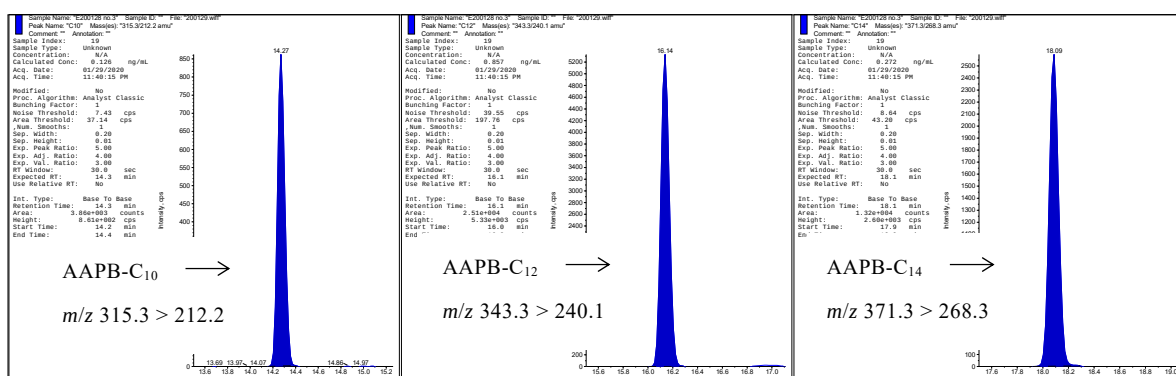


図 8-1 添加回収試験のクロマトグラム（河川水・添加試料）
（AAPB-C₁₀（左図）、 AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図））

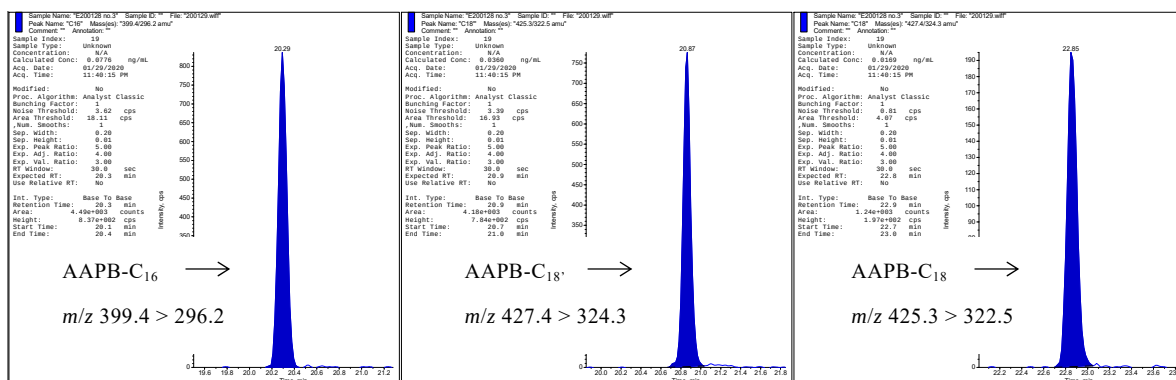


図 8-2 添加回収試験のクロマトグラム（河川水・添加試料）
（AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C₁₈'（中図）、 AAPB-C₁₈（右図））

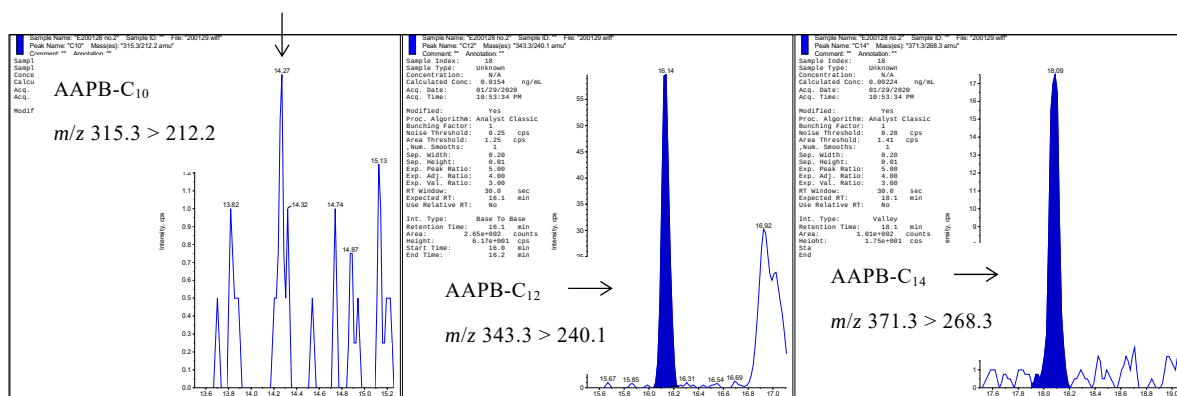


図 8-3 添加回収試験のクロマトグラム（河川水・無添加試料）
（AAPB-C₁₀（左図）、AAPB-C₁₂（中図）、AAPB-C₁₄（右図））

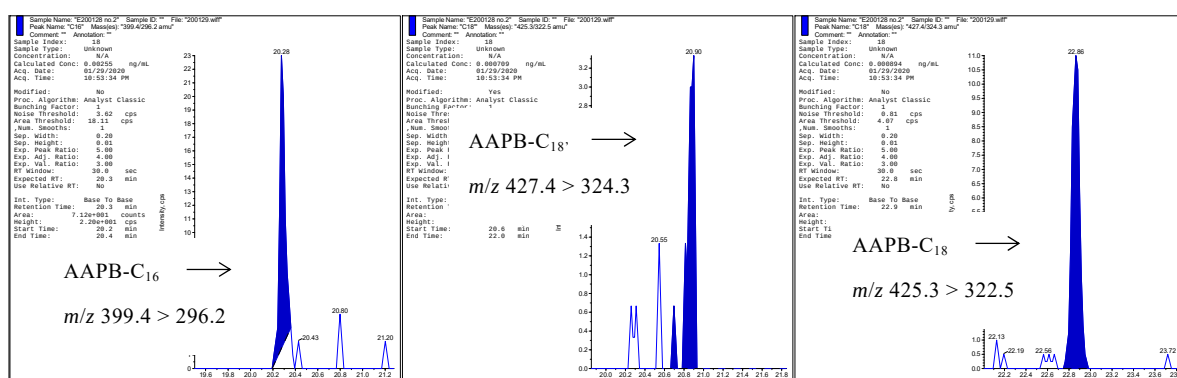


図 8-4 添加回収試験のクロマトグラム（河川水・無添加試料）
（AAPB-C₁₆（左図）、AAPB-C_{18'}（中図）、AAPB-C₁₈（右図））

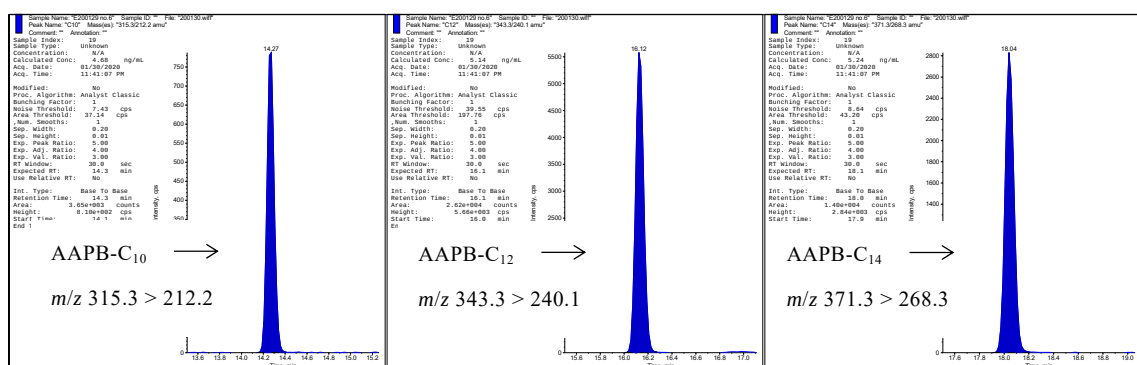


図 8-5 添加回収試験のクロマトグラム（海水・添加試料）
AAPB-C₁₀（左図）、 AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図）

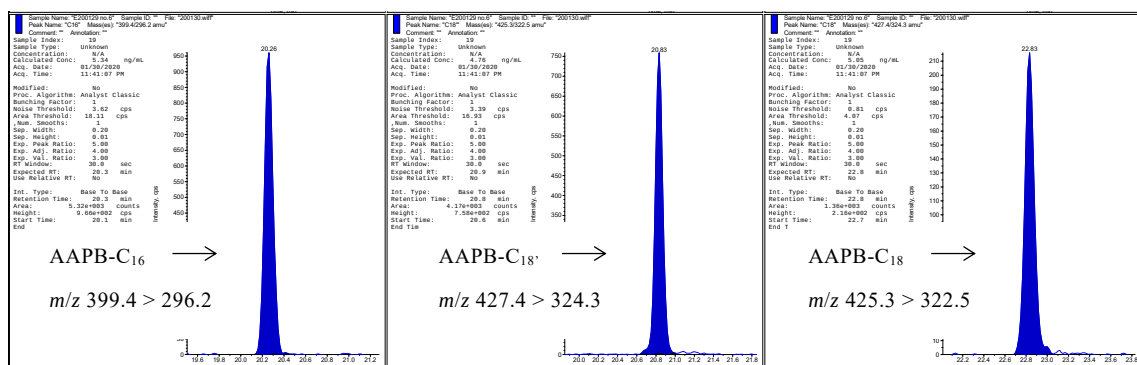


図 8-6 添加回収試験のクロマトグラム（海水・添加試料）
（AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C_{18'}（中図）、 AAPB-C₁₈（右））

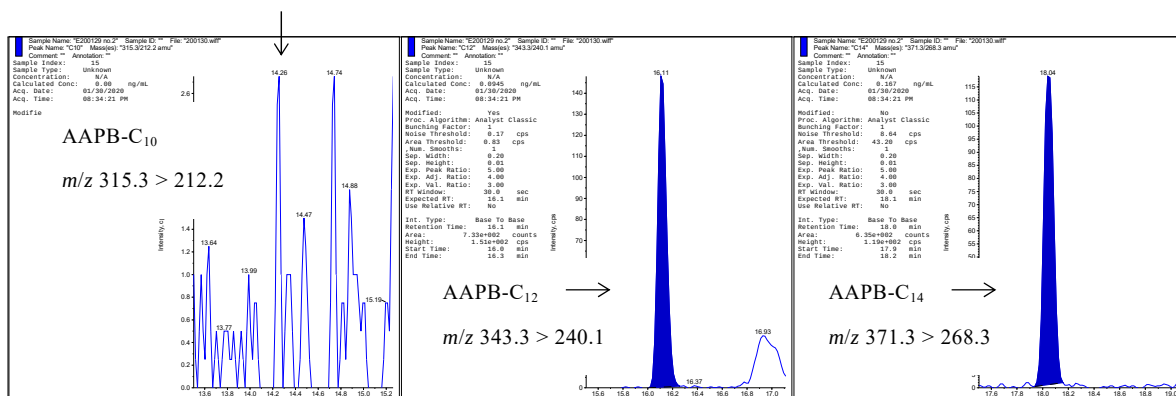


図 8-7 添加回収試験のクロマトグラム（海水・無添加試料）
（AAPB-C₁₀（左図）、AAPB-C₁₂（中図）、AAPB-C₁₄（右図））

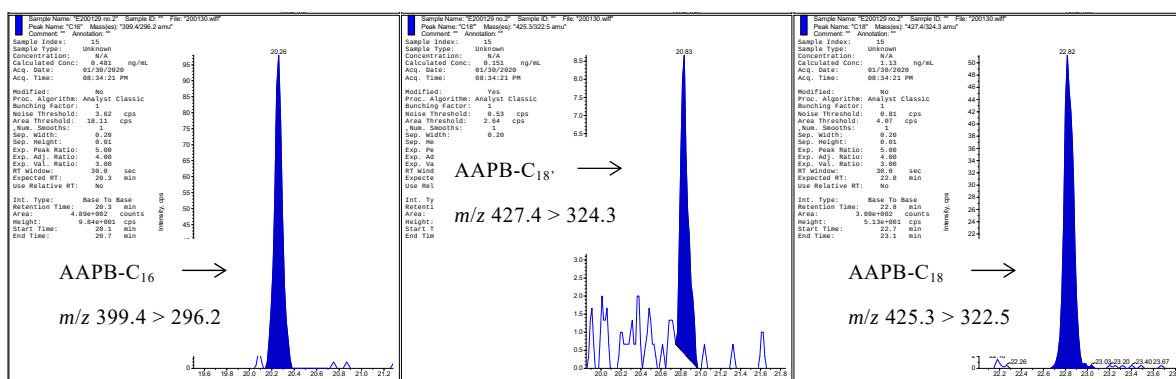


図 8-8 添加回収試験のクロマトグラム（海水・無添加試料）
（AAPB-C₁₆（左図）、AAPB-C_{18'}（中図）、AAPB-C₁₈（右図））

[底質]

底質（和歌山下津港）への添加回収試験の結果を表 9-1～9-6 に、また測定時のクロマトグラムを図 9-1～9-4 に示す。

その結果、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って、底質試料に標準液を添加、12 時間以上静置すると、AAPB-C₁₀ において十分な回収率が得られなかった。一方、底質試料に標準液を添加、加熱による保存処理を行った後、12 時間以上静置すると、十分な回収率が得られた。

この結果をふまえ、本分析法の【試料の採取及び保存】では加熱による保存処理する方法を採用した。

表 9-1 添加回収試験結果(AAPB-C₁₀)

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質*1	2	0.0	10	< 0.64	-	-
	3	65.0	10	4.44	68	1.8
底質*2	2	0.0	10	< 0.64	-	-
	7	65.0	10	5.64	87	2.9

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で 1 日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で 1 日静置

表 9-2 添加回収試験結果(AAPB-C₁₂)

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質*1	2	0.0	10	< 2.6	-	-
	3	447	10	42.7	96	2.7
底質*2	2	0.0	10	< 2.6	-	-
	7	447	10	42.5	95	1.6

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で 1 日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で 1 日静置

表 9-3 添加回収試験結果(AAPB-C₁₄)

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質* ¹	2	0.0	10	< 1.0	-	-
	3	141	10	12.4	88	2.8
底質* ²	2	0.0	10	< 1.0	-	-
	7	141	10	11.6	82	2.3

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で1日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で1日静置

表 9-4 添加回収試験結果(AAPB-C₁₆)

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質* ¹	2	0.0	10	< 0.33	-	-
	3	43.6	10	4.08	94	2.6
底質* ²	2	0.0	10	< 0.33	-	-
	7	43.6	10	3.92	90	2.2

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で1日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で1日静置

表 9-5 添加回収試験結果(AAPB-C_{18'})

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質* ¹	2	0.0	10	< 0.15	-	-
	3	19.0	10	1.79	95	2.6
底質* ²	2	0.0	10	< 0.15	-	-
	7	19.0	10	1.62	85	2.4

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で1日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で1日静置

表 9-6 添加回収試験結果(AAPB-C₁₈)

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
底質* ¹	2	0.0	10	< 0.062	-	-
	3	9.05	10	0.881	97	6.9
底質* ²	2	0.0	10	< 0.062	-	-
	7	9.05	10	0.825	91	1.9

*1：底質試料に標準を添加、冷暗所(4°C)で1日静置

*2：底質試料に標準を添加、保存処理を行った後、冷暗所(4°C)で1日静置

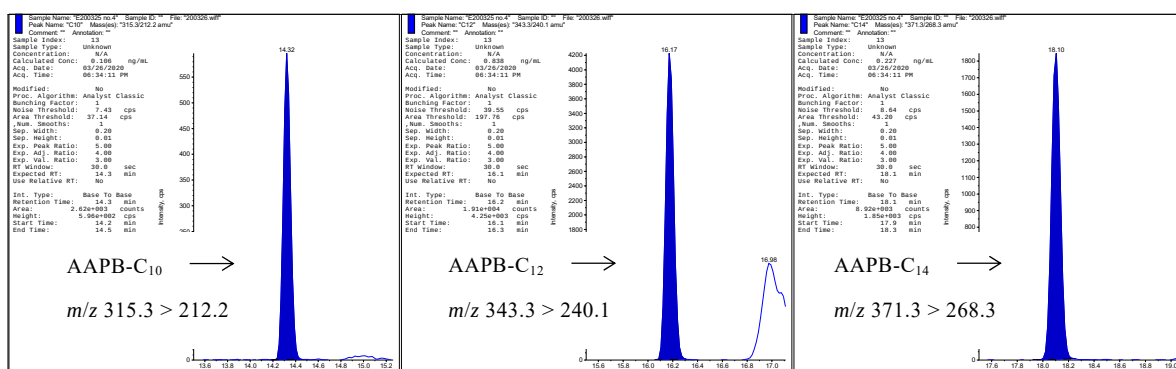


図 9-1 添加回収試験のクロマトグラム（底質・添加試料）
 （AAPB-C₁₀（左図）、AAPB-C₁₂（中図）、AAPB-C₁₄（右図））

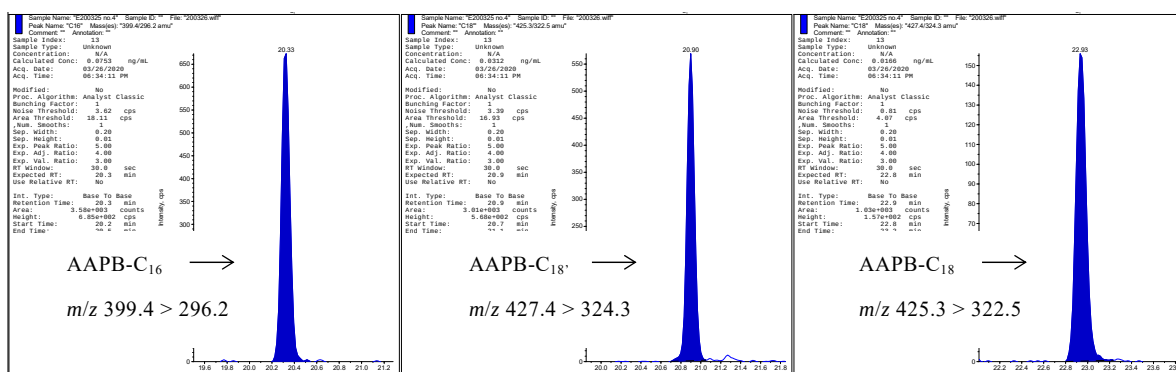


図 9-2 添加回収試験のクロマトグラム（底質・添加試料）
 （AAPB-C₁₆（左図）、AAPB-C_{18'}（中図）、AAPB-C₁₈（右図））

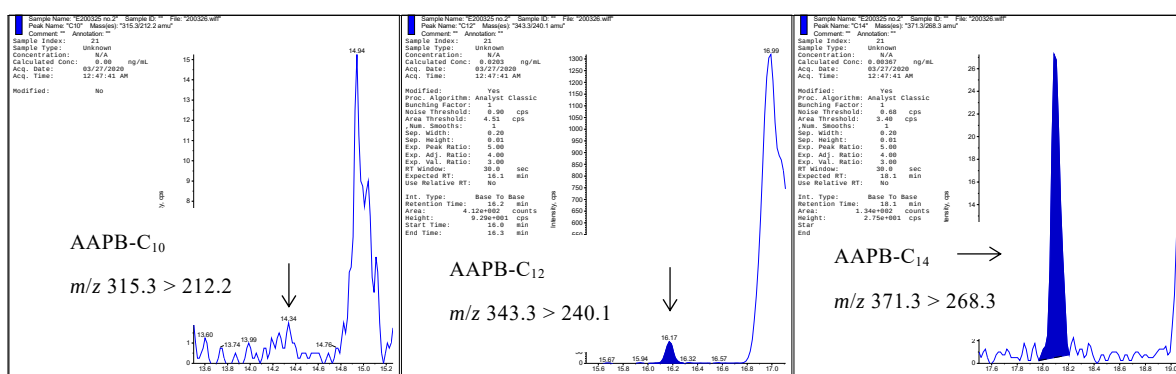


図 9-3 添加回収試験のクロマトグラム（底質・無添加試料）
 （AAPB-C₁₀（左図）、 AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図））

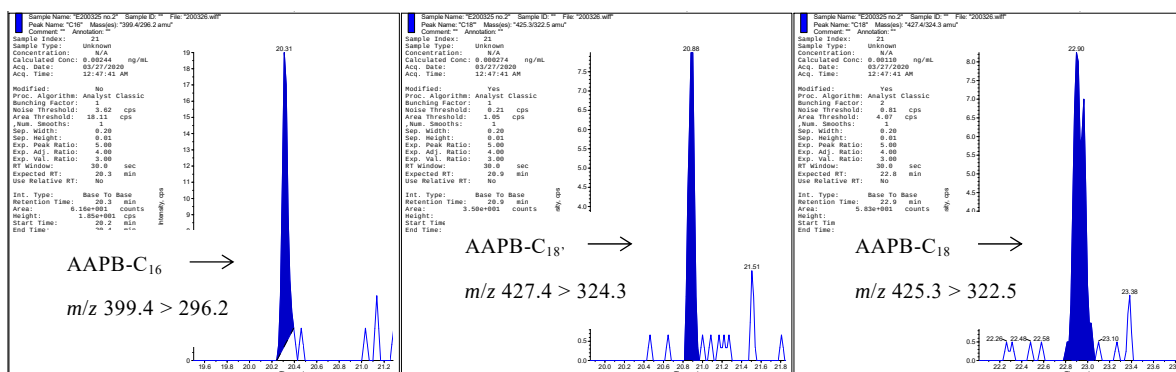


図 9-4 添加回収試験のクロマトグラム（底質・無添加試料）
 （AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C_{18'}（中図）、 AAPB-C₁₈（右図））

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 10 に示す。評価は、pH を 5、7 及び 9 に調整した各々の精製水に標準物質を加え、明所及び暗所で所定の期間保存後、メタノールで希釈し、濃度を測定することで行った。

その結果、明所に 7 日間放置すると、AAPB-C₁₄, AAPB-C₁₆, AAPB-C₁₈′, AAPB-C₁₈において残存率の低下が認められた。なお、本分析法の検討において実施した操作は、遮光等の光に対する対策を講じることなく実施している。

表 10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製濃度 (µg/L)	検出濃度(µg/L) (残存率(%)*)		
				1 時間 放置後	7 日間放置後	
					暗所	明所
AAPB-C ₁₀	5	2	0.65	0.68(105)	0.66(101)	-
	7	2	0.65	0.69(106)	0.68(104)	0.69(106)
	9	2	0.65	0.67(102)	0.68(104)	-
AAPB-C ₁₂	5	2	4.5	4.9(110)	4.6(102)	-
	7	2	4.5	4.8(107)	4.7(105)	4.5(101)
	9	2	4.5	4.7(104)	4.6(103)	-
AAPB-C ₁₄	5	2	1.4	1.6(111)	1.4(100)	-
	7	2	1.4	1.5(103)	1.4(98)	0.32(23)
	9	2	1.4	1.4(102)	1.4(100)	-
AAPB-C ₁₆	5	2	0.44	0.49(113)	0.42(95)	-
	7	2	0.44	0.47(108)	0.41(93)	0.17(39)
	9	2	0.44	0.44(101)	0.43(99)	-
AAPB-C ₁₈ ′	5	2	0.19	0.18(96)	0.18(94)	-
	7	2	0.19	0.18(96)	0.19(98)	0.087(46)
	9	2	0.19	0.18(97)	0.19(100)	-
AAPB-C ₁₈	5	2	0.091	0.091(100)	0.088(97)	-
	7	2	0.091	0.092(102)	0.088(96)	0.048(53)
	9	2	0.091	0.091(100)	0.091(101)	-

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

〔水質〕

環境試料、試験液、標準液における保存性試験結果を表 11-1～11-6 に示す。
環境水については【試料の採取及び保存】に従って標準物質の添加試料を保存処理して 7 日間冷暗所保存後、【試料の前処理及び試験液の調製】に従って前処理を行い、濃度を測定した。標準液および試験液については 1 月間冷暗所保存後、濃度を測定した。

表 11-1 保存性試験結果(AAPB-C₁₀)

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	13.0	2	12.6 (97)	12.1 (93)	-
	海水	13.0	2	12.3 (95)	12.5 (96)	-
試験液	河川水	130	2	-	-	129 (99)
	海水	130	2	-	-	124 (95)
標準液	検量線最低濃度	26.0	1	-	-	23.2 (89)
	検量線最高濃度	260	1	-	-	256 (98)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 11-2 保存性試験結果(AAPB-C₁₂)

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	89.3	2	89.7 (100)	86.8 (97)	-
	海水	89.3	2	90.9 (102)	90.4 (101)	-
試験液	河川水	893	2	-	-	888 (99)
	海水	893	2	-	-	855 (96)
標準液	検量線最低濃度	179	1	-	-	162 (90)
	検量線最高濃度	1790	1	-	-	1760 (98)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 11-3 保存性試験結果(AAPB-C₁₄)

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	28.2	2	28.6(101)	27.1 (96)	-
	海水	28.2	2	28.9(103)	27.5 (98)	-
試験液	河川水	282	2	-	-	275 (98)
	海水	282	2	-	-	272 (96)
標準液	検量線最低濃度	56.4	1	-	-	52.0 (92)
	検量線最高濃度	564	1	-	-	549 (97)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 11-4 保存性試験結果(AAPB-C₁₆)

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	8.72	2	8.56 (98)	8.47 (97)	-
	海水	8.72	2	9.20 (106)	9.03 (104)	-
試験液	河川水	87.2	2	-	-	84.2 (97)
	海水	87.2	2	-	-	87.4 (100)
標準液	検量線最低濃度	17.4	1	-	-	18.0 (103)
	検量線最高濃度	174	1	-	-	172 (99)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 11-5 保存性試験結果(AAPB-C_{18'})

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	3.79	2	3.64 (96)	3.33 (88)	-
	海水	3.79	2	3.67 (97)	3.72 (98)	-
試験液	河川水	37.9	2	-	-	37.7 (99)
	海水	37.9	2	-	-	36.2 (96)
標準液	検量線最低濃度	7.58	1	-	-	7.19 (95)
	検量線最高濃度	75.8	1	-	-	75.1 (99)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 11-6 保存性試験結果(AAPB-C₁₈)

試料名		調製濃度 (ng/L)	試験 数	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
				当日	7 日間	1 月間
環境試料	河川水	1.81	2	1.66 (92)	1.65 (91)	-
	海水	1.81	2	1.86 (103)	1.94 (107)	-
試験液	河川水	18.1	2	-	-	16.6 (92)
	海水	18.1	2	-	-	18.7 (103)
標準液	検量線最低濃度	3.62	1	-	-	3.39 (94)
	検量線最高濃度	36.2	1	-	-	35.3 (98)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

[底質]

環境試料における保存性試験結果を表 12-1、粗抽出液および試験液における保存性試験結果を表 12-2 に示す。底質については【試料の採取及び保存】に従って標準物質の添加試料を保存処理、7 日間及び 14 日間冷暗所保存後、【試料の前処理及び試験液の調製】に従って前処理を行い、濃度を測定した。粗抽出液については 14 日間、試験液については 1 月間、それぞれ冷暗所保存後、濃度を測定した。

表 12-1 保存性試験結果（環境試料）

試料名	物質名	調製濃度 (ng/g-dry)	試験 数	検出濃度(ng/g-dry)（残存率(%)*)		
				当日	7 日間	2 週間
環境試料	AAPB-C ₁₀	6.50	2	5.57(86)	5.39(83)	5.39(83)
	AAPB-C ₁₂	44.7	2	42.4(95)	42.6(95)	43.0(96)
	AAPB-C ₁₄	14.1	2	11.5(82)	12.1(85)	12.1(85)
	AAPB-C ₁₆	4.36	2	3.90(89)	4.08(94)	4.02(92)
	AAPB-C ₁₈ '	1.90	2	1.62(85)	1.69(89)	1.70(90)
	AAPB-C ₁₈	0.905	2	0.825(91)	0.866(96)	0.845(93)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表 12-2 保存性試験結果（粗抽出液及び試験液）

試料名	物質名	調製濃度 (ng/mL)	試験 数	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*)	
				2 週間	1 月間
粗抽出液 (クリーンアップ前)	AAPB-C ₁₀	0.650	2	0.548(84)	-
	AAPB-C ₁₂	4.47	2	4.25(95)	-
	AAPB-C ₁₄	1.41	2	1.19(84)	-
	AAPB-C ₁₆	0.436	2	0.397(91)	-
	AAPB-C ₁₈ '	0.190	2	0.160(84)	-
	AAPB-C ₁₈	0.0905	2	0.0834(92)	-
試験液	AAPB-C ₁₀	0.130	2	-	0.109(84)
	AAPB-C ₁₂	0.894	2	-	0.767(86)
	AAPB-C ₁₄	0.282	2	-	0.233(83)
	AAPB-C ₁₆	0.872	2	-	0.0742(85)
	AAPB-C ₁₈ '	0.380	2	-	0.0308(81)
	AAPB-C ₁₈	0.181	2	-	0.0156(86)

* 残存率(%)：調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

〔工業製品の値付け〕

アルキルアミドプロピルベタインは定量に必要となる標準品が市販されていないため、工業製品を値付けし、標準として使用した。

一般に界面活性剤は混合組成物のため、標準品の合成が難しく、市販されていない。

一方、標準品の存在しない物質の絶対定量が可能な手法として定量 NMR が近年開発され、公定法としても医薬や食品の分野で応用されつつある。

そこで、本検討では定量 NMR を標準物質として利用する工業製品の含有量分析に適用し、分析法の開発を行った。検討には、入手したソフタゾリン CPB（各同族体を含む）及びアンヒトール 20AB（ラウリン酸(C₁₂)を主成分とする脂肪酸を原料とする）を用いた。

〔手順 1: 定量 NMR によりアンヒトール 20AB 中の AAPB-C₁₂ の含有量を決定〕

アンヒトール 20AB の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹H-NMR シグナルの帰属について図 10 に示す。

含有量の計算には不純物の影響が少ないシグナル②を選択した。

内標準として使用した DSS-*d*₆ 認証標準物質((CH₃)₃Si(CD₂)₃SO₃Na)の物質質量、AAPB との積分比、プロトン数比から AAPB の物質質量を求め、さらに全ての AAPB を AAPB-C₁₂ と仮定し、AAPB-C₁₂ の分子量と試料量から AAPB-C₁₂ としての含有量を求めた。

表 13-1、13-2 のとおり、アンヒトール 20AB 中の AAPB-C₁₂ の含有量は 27% と値付けされた。

以上、測定および評価については、一般財団法人日本食品分析センターに委託した。

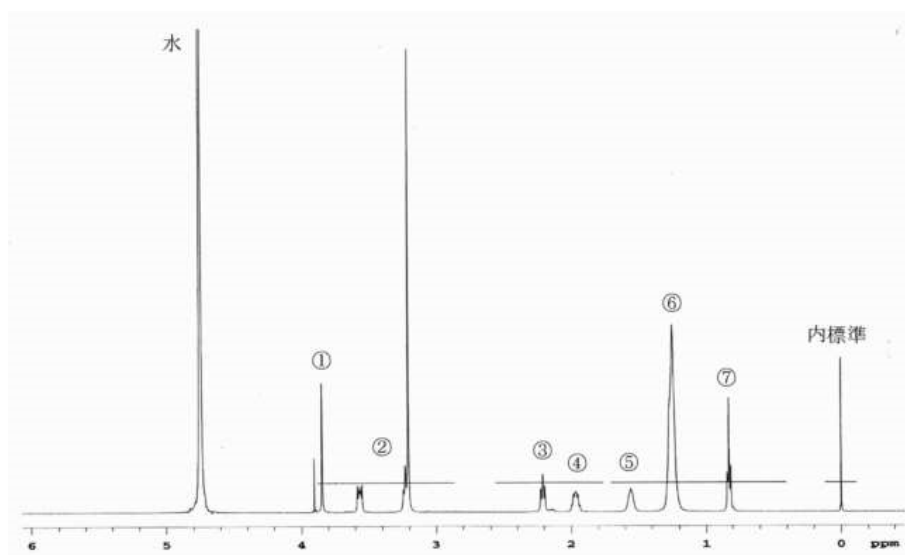
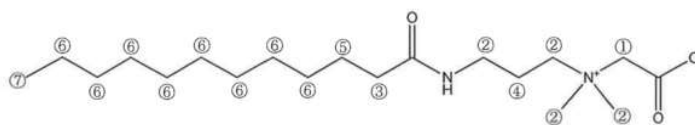


図 10 ^1H -NMR スペクトル及び ^1H -NMR シグナルの帰属
(アンヒトール 20AB)

試験方法

1) ^1H -NMR の測定

アンヒトール 20AB 約 40 mg 及び DSS- d_6 認証標準物質約 1 mg を精密に量り取り、重水 0.75 mL に溶解したものを試験溶液とした。

この溶液の ^1H -NMR を 2) の条件によって測定した。

2) 測定条件

装置：Varian NMR System 500 (Varian, Inc. 製) (水素核 500 MHz-NMR)、観測中心及び観測幅： δ 10 ppm $\pm$ 20 ppm、取り込み時間：4.0 秒、パルス角：90°、待ち時間：60 秒、積算回数：8 回、測定温度：25°C、ダミースキャン：2 回、スピニング：オフ、 ^{13}C デカップリング：オン

表 13-1 検体の定量結果

シグナル	定量値 (%)	
	試験 1 回目	試験 2 回目
②	26.63	26.87

表 13-2 検体の純度結果

検体	純度 (%)
アルキルアミドプロピルベタイン	27

〔手順 2：アンヒトール 20AB を用いて求めたソフタゾリン CPB 中の AAPB-C₁₂ の含有量、及び GC-FID 測定により求めたソフタゾリン CPB のアルキル分布から、各同族体の含有量を決定〕

アンヒトール 20AB を標準として用い、AAPB-C₁₂ の検量線を作成した結果を図 11 に示す。

この検量線に基づき、ソフタゾリン CPB 中の AAPB-C₁₂ を定量した結果、11.9%と値付けされた。

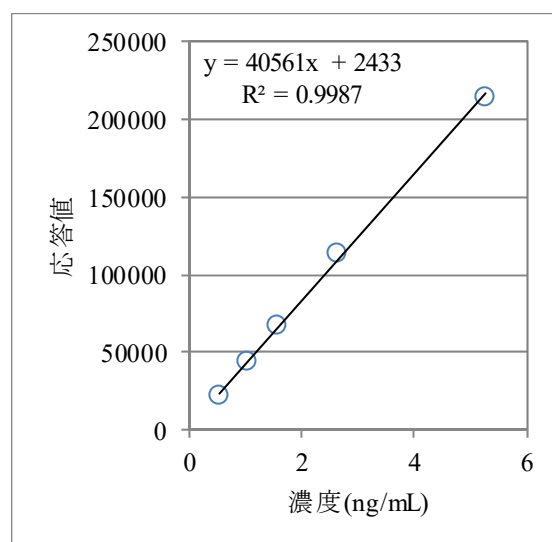


図 11 アンヒトール 20AB を標準とした AAPB-C₁₂ の検量線
(対象物質濃度：0.48～5.2 ng/mL)

試験方法

1) 測定試料

アンヒトール 20AB を適宜メタノールで希釈して 0.48～5.2 ng/mL に調製したもの

2) 測定条件

LC/MS/MS を用いて測定、測定条件は【測定】〔LC/MS/MS 条件〕のとおり

次に、ソフタゾリン CPB 及びアンヒトール 20AB の GC-FID クロマトグラムを図 12-1、12-2 に示す。ソフタゾリン CPB の GC-FID クロマトグラムには全ての同族体に起因する熱分解物のシグナル、アンヒトール 20AB には C₁₂ を主成分とする熱分解物のシグナルが検出され、それぞれ積分比から算出したアルキル分布を表 14 に示す。アンヒトール 20AB のアルキル分布は C₁₂ が 99%であり、手順 1 ではこれを根拠として全ての AAPB を AAPB-C₁₂ と仮定し、AAPB-C₁₂ の含有量を求めている。

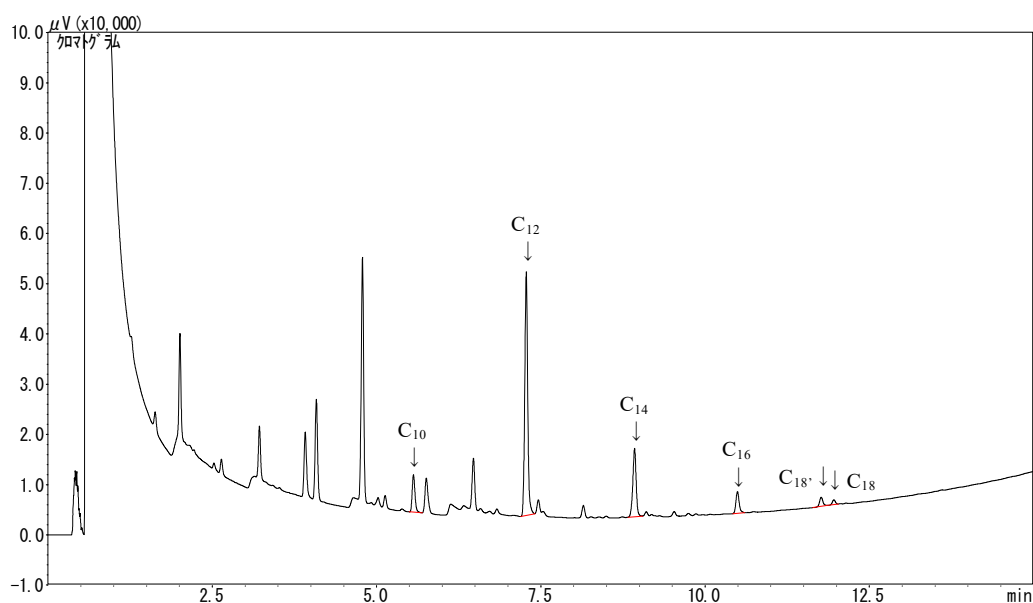


図 12-1 ソフタゾリン CPB の GC-FID クロマトグラム

試験方法

1) 測定試料

ソフタゾリン CPB 50 mg、水酸化カリウム 0.15 g をエタノール 4.85 g に溶解させたもの*1

2) 測定条件

装置：GC-2014、カラム：HP-5ms ui 15 m × 0.25 mm, 0.25 μ m、カラム温度：150°C→10°C/min→300°C、注入口温度：270°C、試料導入方法：スプリ

ット（スプリット比 10:1）ウールあり、注入量 1 μ L

*1: 界面活性剤評価・試験法編集委員会：界面活性剤評価-試験法，製法・物性・応用・分析・環境-第二版，公益社団法人日本油化学会（平成 28 年 3 月 1 日）

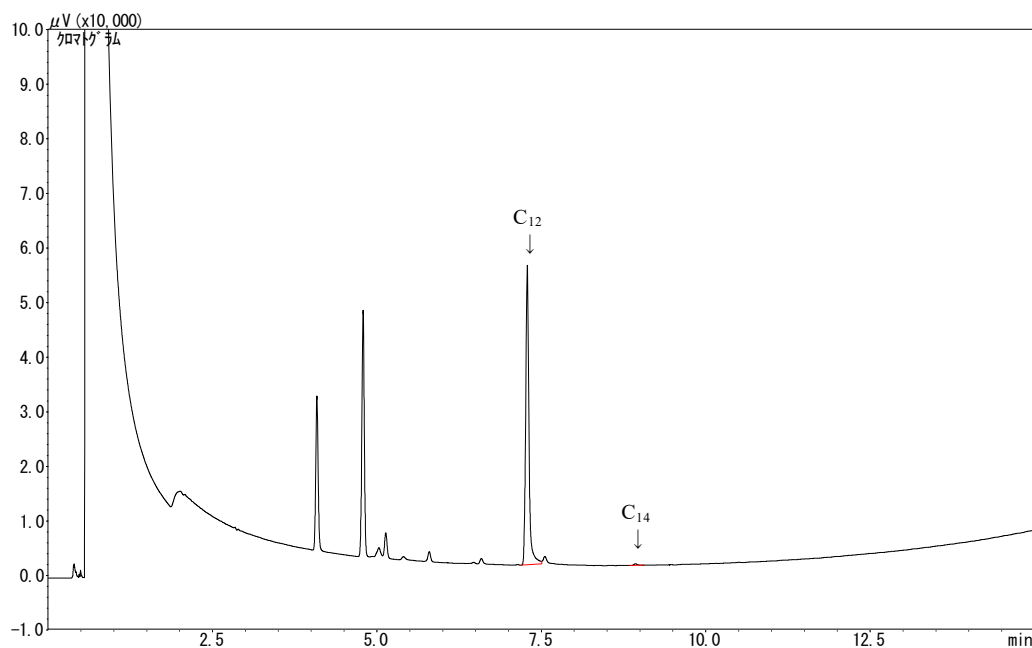


図 12-2 アンヒトール 20AB の GC-FID クロマトグラム

試験方法

1) 測定試料

アンヒトール 20AB 50 mg、水酸化カリウム 0.15 g をエタノール 4.85 g に溶解させたもの*1

2) 測定条件

装置：GC-2014、カラム：HP-5ms ui 15 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m、カラム温度：150°C $\rightarrow$ 10°C/min $\rightarrow$ 300°C、注入口温度：270°C、試料導入方法：スプリット（スプリット比 10:1）ウールあり、注入量 1 μ L

*1: 界面活性剤評価・試験法編集委員会：界面活性剤評価-試験法，製法・物性・応用・分析・環境-第二版，公益社団法人日本油化学会（平成 28 年 3 月 1 日）

表 14 GC-FID 測定により算出したアルキル(C₁₀～C₁₈, C_{18'})分布*

試料	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{18'}	C ₁₈
ソフタゾリン CPB	9.0%	62%	20%	6.0%	2.6%	1.3%
アンヒトール 20AB	-	99%	0.57%	-	-	-

* 試験数：1 回

次に、アンヒトール 20AB によるソフタゾリン CPB 中の AAPB-C₁₂ の含有量、及び GC-FID 測定により求めたアルキル分布から求めたソフタゾリン CPB 中の各同族体の含有量を表 15 に示す。

表 15 各同族体の値付け結果（ソフタゾリン CPB 中各同族体含有量）

	アルキル分布 (%)	含有量 (%)
AAPB-C ₁₀	9.0	1.7
AAPB-C ₁₂	62	12
AAPB-C ₁₄	20	3.8
AAPB-C ₁₆	6.0	1.2
AAPB-C _{18'}	2.6	0.51
AAPB-C ₁₈	1.3	0.24

〔アルキル分布の帰属〕

GC/MS スキャン測定により GC-FID 測定で検出された熱分解物を同定した。測定したマススペクトルを図 13 に示す。

C₁₂ については m/z 284 が検出され、四級アンモニウムで開裂して生成したジメチルアミンと帰属した。

他の同族体についても、ジメチルアミンに対応する m/z が検出されることから、熱分解物は全てジメチルアミンであり、由来が共通する。

製造時における反応率、GC-FID における熱分解率について、各同族体間で差がないものと仮定すると、アルキル分布をアルキルアミドプロピルベタインの分布に対応するとみなすことができ、このことを裏付けとして、値付けを行っている。

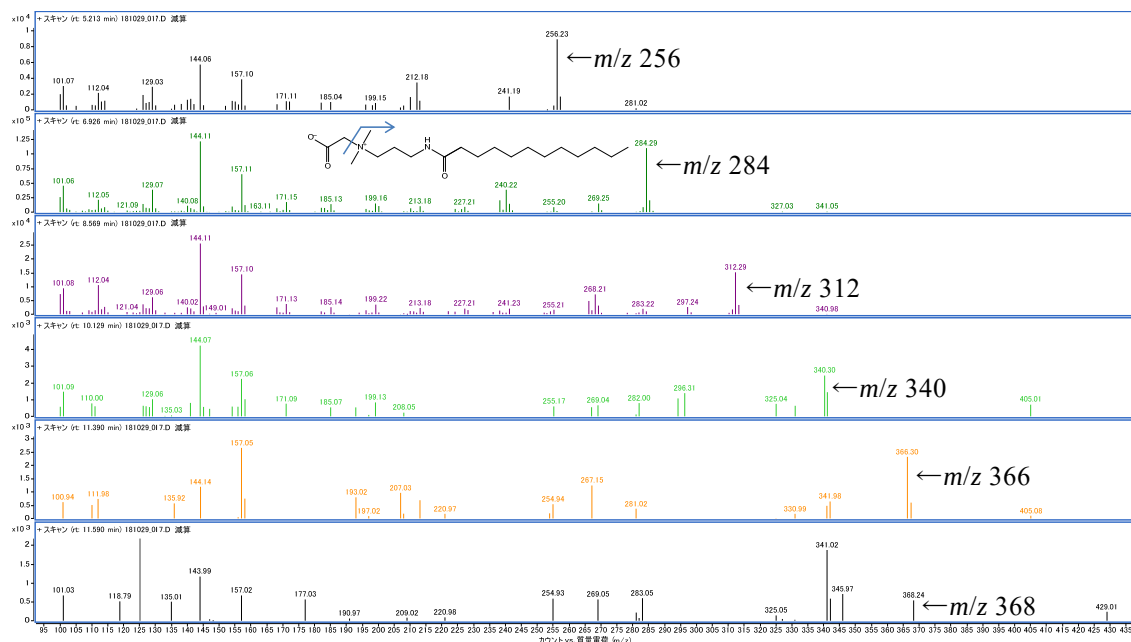


図 13 GC-FID 測定で検出された熱分解物に対応するマススペクトル (ソフタズリン CPB) (GC/MS スキャン測定)

〔溶解性〕

基本的な物性を把握し、分析法の参考とすることを目的として、AAPB 各同族体のメタノール水に対する溶解性を図 14 に示す。

結果、AAPB-C₁₀ 及び AAPB-C₁₂ についてはメタノール含有率、保存期間によらず残存率 100%を維持したのに対して、AAPB-C₁₈ については溶解した状態を維持するためメタノール含有率 40%を要した。

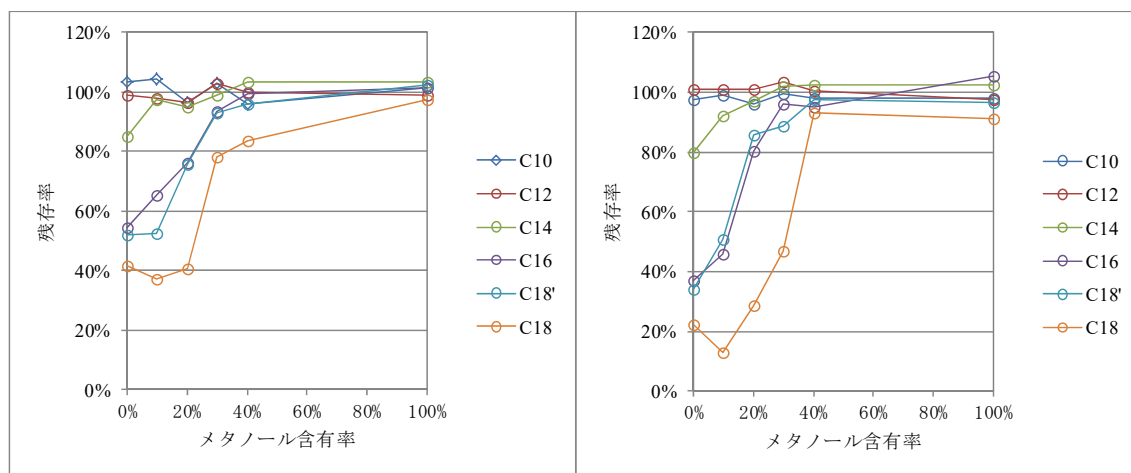


図 14 AAPB の残存率

調製直後（左図）、冷蔵保存 7 日目（右図）

（条件：ソフタズリン CPB として 14 $\mu\text{g/L}$ 、メタノール含有率 0~100%,
冷蔵温度 4°C、残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合）

〔固相カートリッジの検討〕

(検討 1)

水質試料 100 mL をメタノール/水質試料(40:60)に調整後、AAPB を抽出することを想定して、ソフタゾリン CPB として 137.5 ng を固相カートリッジに直置きし、メタノール/精製水(40:60) 200 mL を通液後、メタノール 10 mL で溶出、溶出液を 10 mL に定容し、回収率を求めた。

結果を表 16 に示す。いずれの固相カートリッジにおいても AAPB-C₁₀ を保持できず、水質試料を 40%メタノール濃度に調整できなかった。

固相カートリッジの保持能力は Sep-Pak plus PS2 が比較的に優れていた。

表 16 各種固相カートリッジの検討結果

固相カートリッ ジ	回収率(%)					
	AAPB- C ₁₀	AAPB- C ₁₂	AAPB- C ₁₄	AAPB- C ₁₆	AAPB- C ₁₈ *	AAPB- C ₁₈
Sep-Pak plus PS2	16	106	106	104	119	121
Sep-Pak plus C18	0	47	96	97	96	101
Oasis MAX plus	0	51	100	96	105	104

(検討 2)

水質試料 100 mL を固相カートリッジに通液、メタノールによる試料採取容器の壁面付着分の洗い込み、メタノール水によるクリーンアップを想定して、ソフタゾリン CPB として 137.5 ng を Sep-Pak PS2 に直置きし、メタノール/精製水(40:60) 10~50 mL を通液後、メタノール 10 mL で溶出、溶出液を 10 mL に定容し、回収率を求めた。

結果を表 17 に示す。10~50 mL のメタノール/精製水(40:60)の通液による AAPB の損失はなく、Sep-Pak PS2 に保持できることを確認した。

表 17 固相カートリッジ(Sep-Pak PS2)の保持能力

メタノール/ 精製水(40:60)	回収率(%)					
	AAPB- C ₁₀	AAPB- C ₁₂	AAPB- C ₁₄	AAPB- C ₁₆	AAPB- C ₁₈ *	AAPB- C ₁₈
10 mL	99	101	98	106	99	114
20 mL	101	101	95	102	100	101
30 mL	98	103	100	102	103	111
40 mL	101	105	104	101	114	118
50 mL	96	105	104	108	110	113

(検討 3)

底質 10 g をメタノール抽出し、抽出液を 100 mL に定容後、2 mL を分取して 40%メタノール濃度に調整後、イオン交換系固相カートリッジでクリーンアップすることを想定して、ソフタゾリン CPB として 137.5 ng を Oasis MCX に直置きし、メタノール/精製水(40:60) 5 mL、ギ酸/精製水(2:98) 10 mL、メタノール 10 mL を通液、25%アンモニア水/メタノール(5:95) 10 mL で溶出、さらに溶出液を精製水 15 mL で希釈後、Sep-Pak PS2 に通液、メタノール 10 mL で溶出した試験液を分析し、回収率を求めた。

結果を表 18 に示す。結果、全ての同族体で回収率が良好であり、イオン交換による保持が可能であった。

表 18 固相カートリッジ(Oasis MCX)の保持能力

固相 カートリッジ	回収率(%)					
	AAPB- C ₁₀	AAPB- C ₁₂	AAPB- C ₁₄	AAPB- C ₁₆	AAPB- C ₁₈	AAPB- C ₁₈
Oasis MCX	107	108	104	94	97	99

〔分析条件の検討〕

溶離液として 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液を使用すると、AAPB-C₁₈のピーク形状及び感度が向上した。 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、精製水を溶離液として使用した場合のクロマトグラムを図 15-1、15-2 に示す。

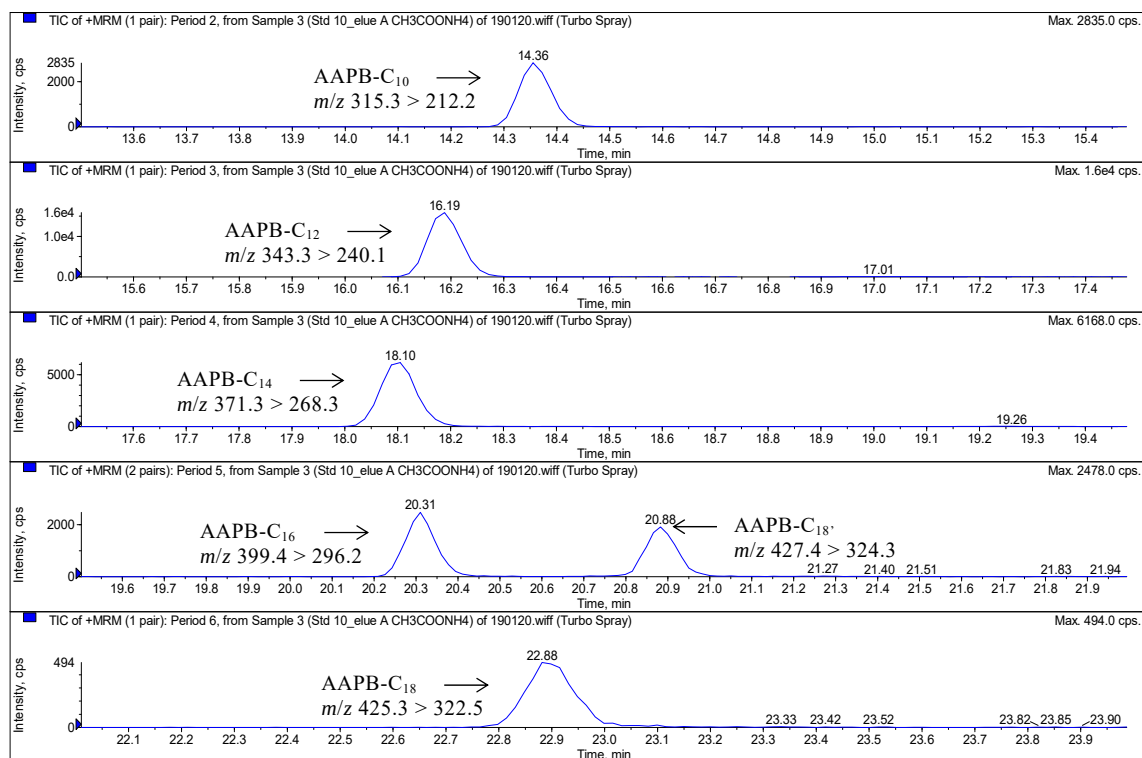


図 15-1 SRM クロマトグラム (溶離液 A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム)
(上から順に AAPB-C₁₀、AAPB-C₁₂、AAPB-C₁₄、AAPB-C₁₆ 及び AAPB-C₁₈、
AAPB-C₁₈)

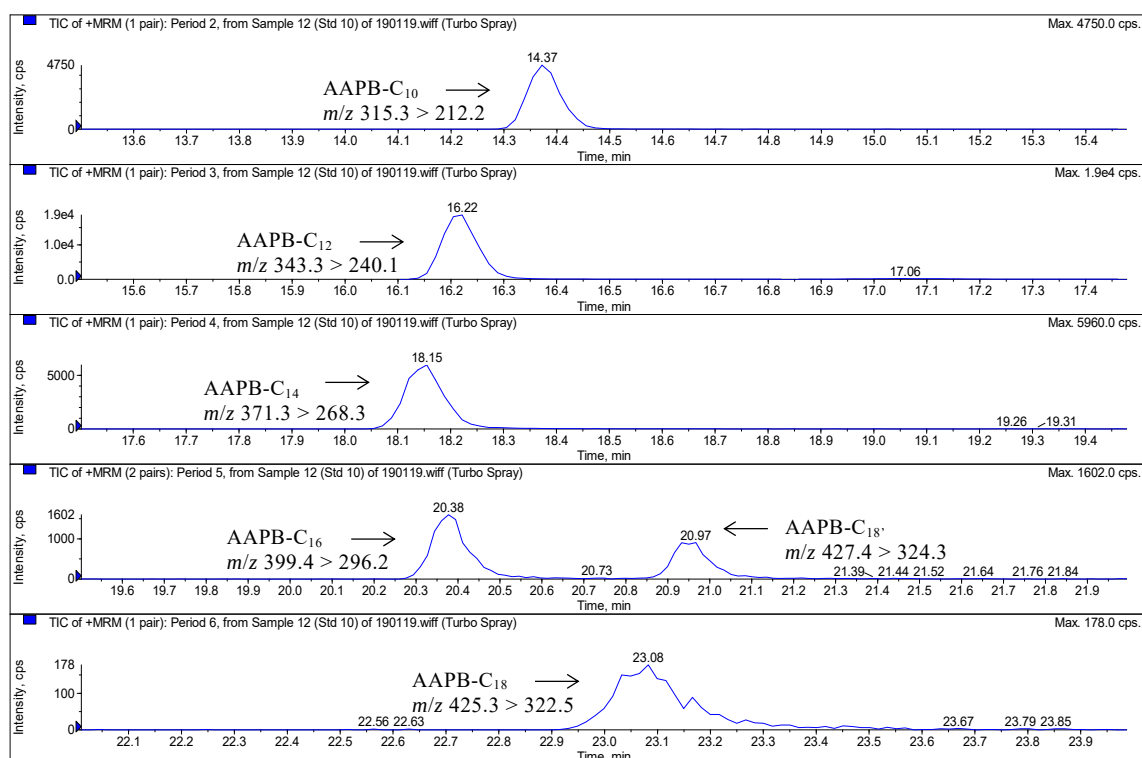


図 15-2 SRM クロマトグラム (溶離液 A : 精製水)
(上から順に AAPB-C₁₀、AAPB-C₁₂、AAPB-C₁₄、AAPB-C₁₆ 及び AAPB-C₁₈、
AAPB-C₁₈)

〔抽出溶媒の検討〕

底質から AAPB を抽出する溶媒の検討を行った。底質試料 (和歌山港) 10 g (dry 換算) に標準液 (ソフタゾリン CPB として 15 µg/mL の標準液 0.25 mL) を添加し、添加直後にメタノールまたは 25%アンモニア水/メタノール (5:95) により抽出して回収率を比較した。

結果を表 19 に示す。抽出溶媒が「メタノール」の場合、十分な回収率が得られなかった。ここで 1 回の遠心分離で回収される上澄みの液量は全体の 75%程度であり、これは 3 回の繰り返し操作で AAPB の 98%を抽出できる割合に相当するが、後処理を考慮しても得られる回収率が低く、イオン結合による吸着によって抽出が阻害されているものと推測した。

そこで抽出溶媒を「25%アンモニア水/メタノール (5:95)」としたところ良好な回収率が得られた。なお、安定して AAPB を抽出するためには 25%アンモニア水/メタノールを加温する必要がある、室温では十分な回収率が得られなかった。

表 19 AAPB の抽出溶媒の検討

抽出溶媒	回収率(%) (n=1)					
	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈ *	C ₁₈
メタノール	66	74	71	78	69	73
25%アンモニア水/メタノール (5:95)	85	93	92	93	80	84

〔保存条件の検討〕

〔水質〕

水質試料の保存条件を検討した。河川水（紀の川）100 mL に標準液（ソフタゾリン CPB として 75 ng/mL の標準液 1 mL）を添加し、試料容器にはガラスを使用、保存処理を行い 7 日間冷蔵保存後の残存率を求めた。

結果を表 20 に示す。保存処理を行わない「無処理」では十分な回収率が得られず、「アセトニトリル添加＋加熱処理」において、良好な回収率が得られた。

加熱処理のタイミングは、「アセトニトリル添加＋2 日後加熱処理」において良好な回収率が得られたことから、アセトニトリルの添加後 2 日間までに加熱処理を行えばよいと考えられ、現地でアセトニトリルを添加して持ち帰ったのち加熱処理できるため、実際の採水作業に対応できる。

なお「アセトニトリル添加」だけでは十分な保存効果は得られず、また「加熱処理」についても、加熱処理する際の濃度の低下が避けられなかった。それぞれの組み合わせにより、加熱処理の際の濃度の低下を回避しつつ、良好な保存が可能であった。

表 20 保存処理条件検討（水質試料）

保存条件	残存率(%) ^{*1} (n=1)					
	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈ *	C ₁₈
無処理	26	2	2	14	17	19
アセトニトリル添加 ^{*2} ＋加熱処理 ^{*3}	94	98	100	100	81	89
アセトニトリル添加 ^{*2} ＋2 日後加熱処理 ^{*3}	96	87	90	82	85	75
アセトニトリル添加 ^{*2}	98	-	95	51	57	57
加熱処理 ^{*3}	96	57	23	33	35	42
予め加熱処理 ^{*3} した環境試料	96	96	96	100	89	88

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：アセトニトリル添加量 10 mL

*3：乾燥機を使用 95°C 1 Hr

〔底質〕

底質試料の保存条件を検討した。底質試料（和歌山港）10 g（dry 換算）に標準液（ソフタゾリン CPB として 15 µg/mL の標準液 0.25 mL）を添加、保存処理を行い、冷蔵保存後の回収率を求めた。

結果を表 21-1～21-6 に示す。保存処理を行わない「無処理」では、アルキル鎖長の短いものほど残存率が低下し易い傾向であった。底質の保存期間について残存率 70%を目安として判定すると、AAPB-C₁₀ については 1 日間、アルキルアミドプロピルベタインの主成分である AAPB-C₁₂ については 3 日間の保存が可能である。

保存条件として「加熱処理」「アセトニトリル添加＋加熱処理」では残存率は低下せず、加熱処理をすればアセトニトリルの添加による効果ははっきりしない。底質を保存する場合、加熱処理することとし、加熱処理のタイミングは採取後 1 日以内、少なくとも 3 日以内に行うものとした。

表 21-1 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₀)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	64	44	24	15
加熱処理* ²	71	74	67	69
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	76	77	73	77

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

表 21-2 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₂)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	86	79	52	43
加熱処理* ²	83	87	75	81
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	87	89	77	86

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

表 21-3 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₄)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	78	80	57	51
加熱処理* ²	73	76	64	72
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	76	79	67	75

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

表 21-4 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₆)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	85	92	73	70
加熱処理* ²	82	81	77	81
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	81	79	77	83

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

表 21-5 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₈)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	90	84	72	60
加熱処理* ²	74	77	71	69
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	78	77	69	77

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

表 21-6 保存処理条件検討（底質試料）(AAPB-C₁₈)

保存条件	残存率(%)* ¹ (n=1)			
	1 日間	3 日間	7 日間	2 週間
無処理	92	84	87	82
加熱処理* ²	86	73	82	82
アセトニトリル添加＋加熱処理* ³	82	83	81	96

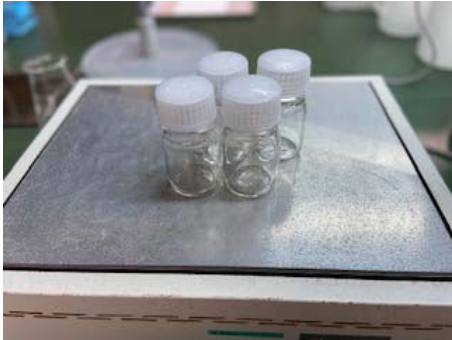
*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

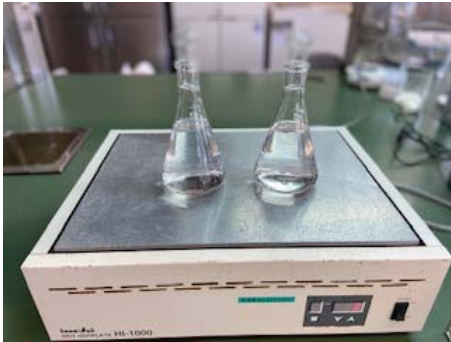
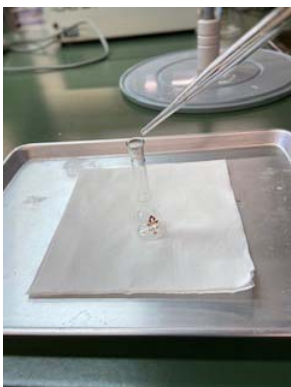
*2：乾燥機 95°C、1 時間

*3：アセトニトリル 1 mL を添加、降り混ぜた後、乾燥機 95°C、1 時間加熱

〔操作方法〕

各工程の実施例を写真に示す。

	・ 保存処理（水質） 蓋を閉め密閉状態とし、乾燥機又は湯煎機で加熱する。
	・ 洗浄操作（水質） 試料採取容器にメタノール 10 mL を加え、蓋を閉め密閉状態とし、ホットプレート上で約 55℃ に加温する。
	・ 保存処理（底質） 蓋を閉め密閉状態とし、乾燥機又は湯煎機で加熱する。

	抽出操作（底質） 蓋を閉め、湯浴(70°C)に浸漬する。
	メタノールの加温 三角フラスコにメタノールを加えドラフト内に設置したホットプレート上で約 55°C に加温する。 (一度蓋を取って内圧を逃がしてやると蓋は飛ばない)
	ガラス器具洗淨 メスフラスコ、試料採取容器、バイアル等は、メタノールを加え、蓋を閉め密閉状態とし、ホットプレート上で約 55°C に加温する。
	ガラス器具洗淨 メスフラスコ、試料採取容器は口元からコンタミし易いため、加温したメタノールで洗い流す。

〔環境試料の分析例〕

本法を用いて、和歌山県内の河川水（紀の川）、海水及び底質（和歌山下津港（本港区））を用いて分析した結果、河川水で AAPB-C₁₀ 2.1 ng/L、AAPB-C₁₂ 15 ng/L、AAPB-C₁₄ 3.0 ng/L、AAPB-C₁₈ 0.20 ng/L が検出、AAPB-C₁₆ 及び AAPB-C₁₈については MDL 未満であった。海水及び底質についてはいずれも MDL 未満であった。

河川水のクロマトグラムを図 16-1、16-2、海水のクロマトグラムを図 16-3、16-4、底質のクロマトグラムを図 9-3、9-4 にそれぞれ示す。

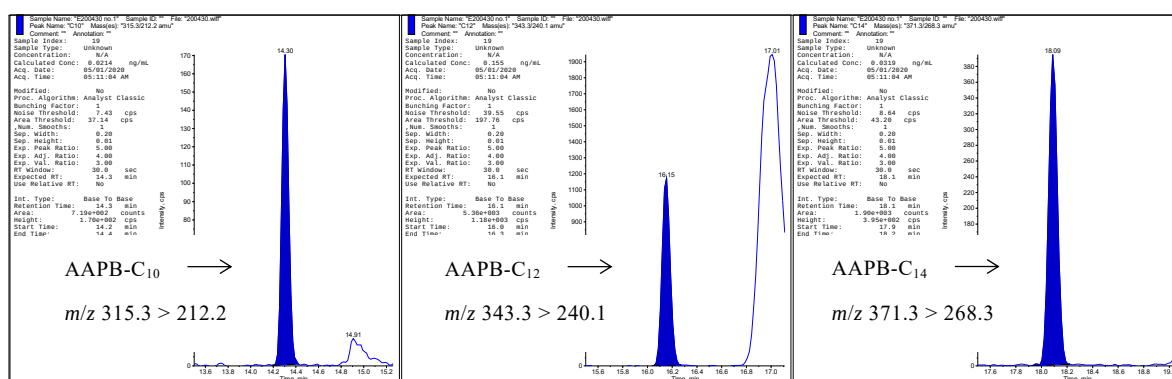


図 16-1 河川水（紀の川）試料のクロマトグラム
(AAPB-C₁₀ (左図)、 AAPB-C₁₂ (中図)、 AAPB-C₁₄ (右図))

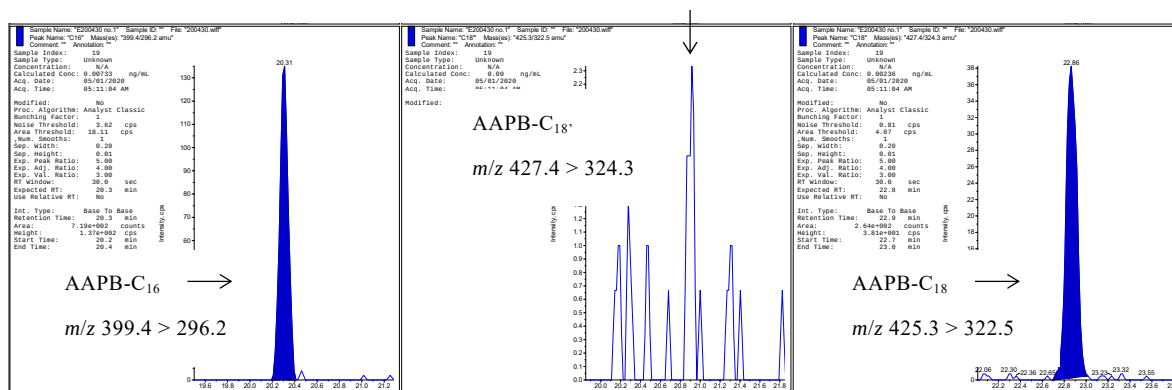


図 16-2 河川水（紀の川）試料のクロマトグラム
(AAPB-C₁₆ (左図)、 AAPB-C₁₈' (中図)、 AAPB-C₁₈ (右図))

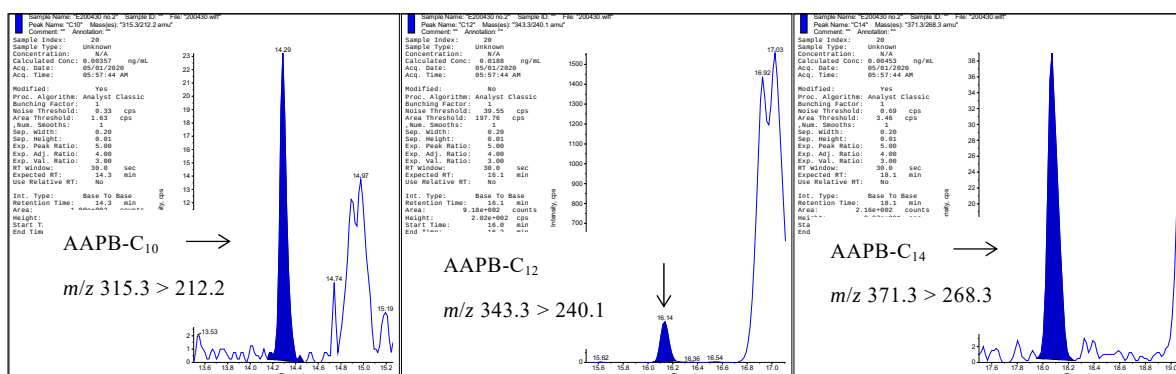


図 16-3 海水（和歌山下津港）試料のクロマトグラム
（AAPB-C₁₀（左図）、 AAPB-C₁₂（中図）、 AAPB-C₁₄（右図））

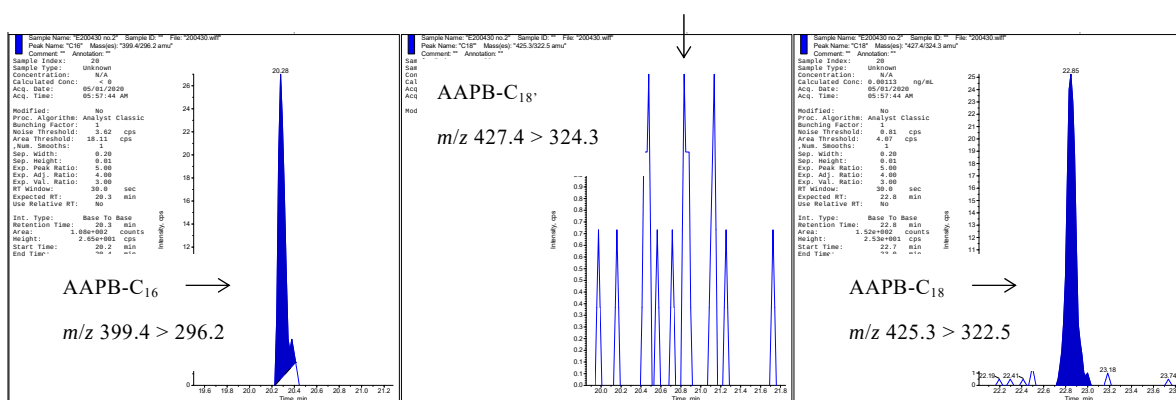


図 16-4 海水（和歌山下津港）試料のクロマトグラム
AAPB-C₁₆（左図）、 AAPB-C_{18'}（中図）、 AAPB-C₁₈（右図）

【評価】

環境水中及び底質中に含まれるアルキルアミドプロピルベタイン（AAPB-C₁₀、AAPB-C₁₂、AAPB-C₁₄、AAPB-C₁₆、AAPB-C_{18'}、AAPB-C₁₈）の分析法を開発した。本法における水質の MDL は水質で 0.14～15 ng/L、底質で 0.062～2.6 ng/g-dry であった。添加回収試験の回収率は、河川水で 92%～101%、海水で 95%～106%、底質で 82%～95% であった。

以上の結果から、本法は環境水中及び底質中に含まれるそれぞれ 0.2～20 ng/L オーダ、0.07～3 ng/g-dry オーダのアルキルアミドプロピルベタインの検出に適用可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) 齋藤 剛, 井原 俊英, 佐藤 浩志, Harald JANCKE, 衣笠 晋一. ¹H 核磁気共鳴法による水溶液中のエタノールの定量に関する国際比較. BUNSEKI KAGAKU. 2003, Vol. 52, No. 11, pp. 1029-1036
- 2) 界面活性剤評価・試験法・製法・物性・応用・分析・環境-第二版（公益財

団法人日本油化学会)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 和歌山県環境衛生研究センター

所属先住所 : 〒640-8272 和歌山県和歌山市砂山南 3 丁目 3-45

TEL:073-423-9570、FAX:073-423-8798

担当者名 : 山本 道方

E-mail : yamamoto_m0096@pref.wakayama.lg.jp

2-[(3-Decanamidopropyl)dimethyl]ammonio]acetate (Alkylamidopropyl betaine)

This method provides procedures for the determination of alkylamidopropylbetaine (AAPBs : AAPB-C₁₀, AAPB-C₁₂, AAPB-C₁₄, AAPB-C₁₆, AAPB-C₁₈, AAPB-C₁₈) in environmental waters and sediment samples by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS/MS).

[Water sample]

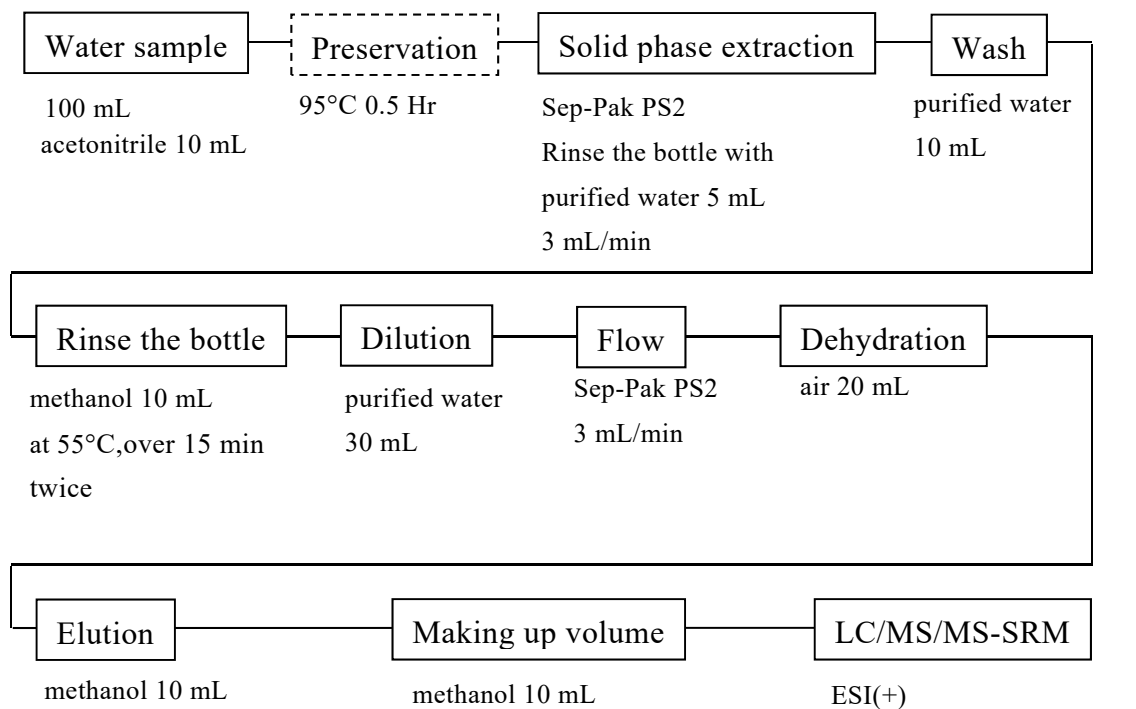
Acetonitrile (10 mL) is added to a water sample (100 mL), and further, if necessary, the sample is heated at 95°C for preservation of AAPBs. AAPBs are extracted from the preserved sample by passing through a solid phase extraction cartridge (Sep-Pak PS2). The cartridge is washed with 10 mL of purified water. Then analytes are eluted with 10 mL of methanol, and then the volume of the eluate are adjusted to 10 mL with methanol. The analytes are determined by LC/MS/MS-SRM (ESI positive). The method detection limits (MDL) of AAPBs are 0.14 - 15 ng/L. The average recoveries of AAPBs in river water and sea water were 92% - 101% and 95%-106%, respectively. Using this method, the concentrations of AAPB-C₁₀, AAPB-C₁₂, AAPB-C₁₄ and AAPB-C₁₈ were detected to be 2.1 ng/L, 15 ng/L, 3.0 ng/L and 0.20 ng/L, respectively, in river-water in Wakayama prefecture.

[Sediment sample]

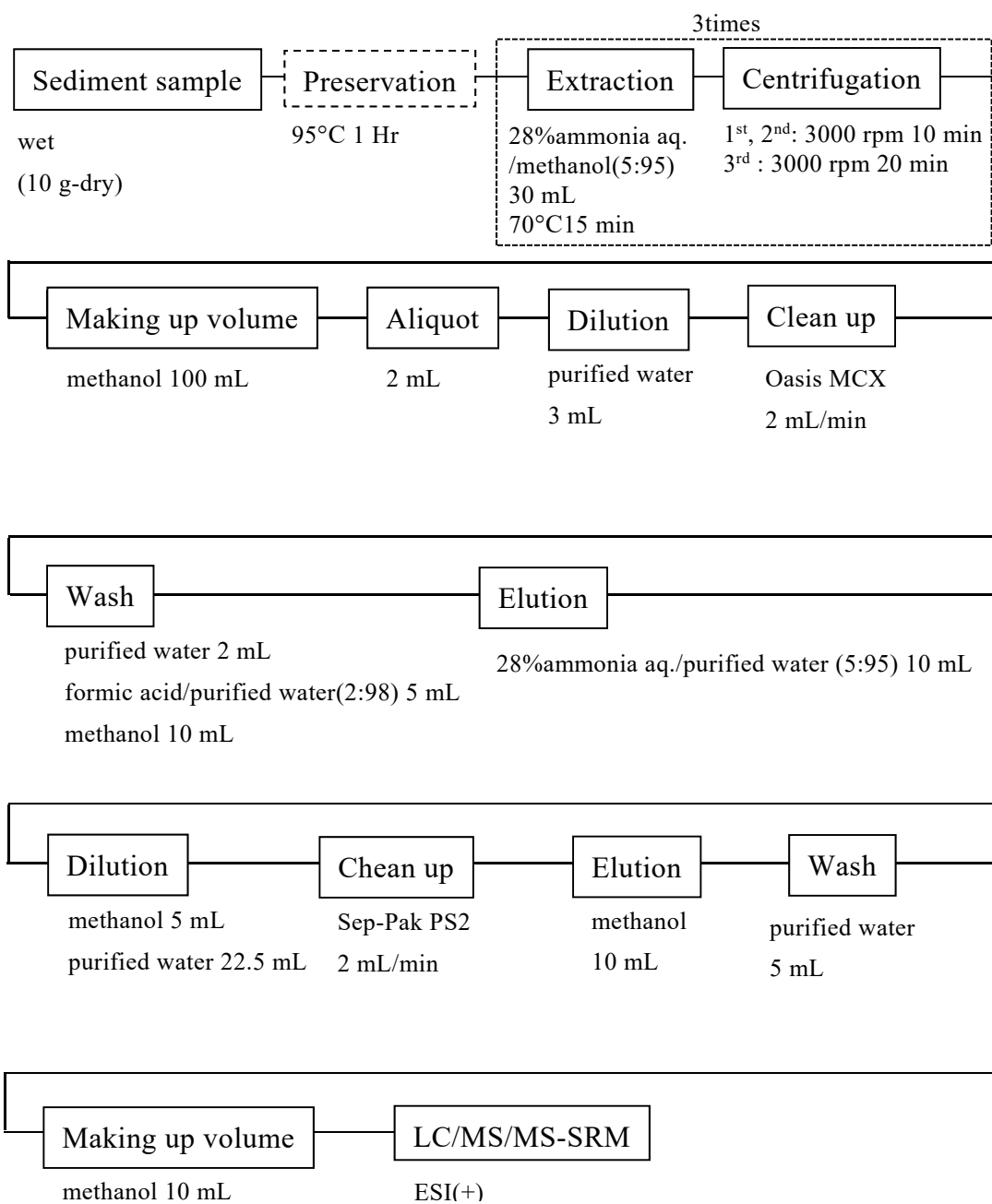
A sediment sample (10 g-dry) is heated at 95°C for preservation of AAPBs if necessary. The preserved sample is extracted by with 30 mL of heated 28% ammonia aq./methanol (5:95), three times and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes after each extraction.

The combined extracts are made up to 100 mL with methanol. An aliquot (2 mL) of the extracts are diluted with 3 mL of purified water, and then the solution is loaded to a solid phase extraction cartridge (Oasis MCX). The cartridge is washed with 2 mL of purified water, 5 mL of formic acid/purified water (2:98), and methanol, subsequently. Then analytes are eluted with 10 mL of 28% ammonia aq./methanol (5:95). The elute is diluted with 5 mL of methanol and 22.5 mL of purified water, and then the solution is loaded to a solid phase extraction cartridge (Sep-pak PS2). The cartridge is washed with 5 mL of purified water, and then analytes are eluted with 10 mL of methanol. The elute is made up to 10 mL with methanol.

The analyte is determined by LC/MS/MS-SRM (ESI positive). The method detection limits (MDL) of AAPBs are 0.062 - 2.6 ng/g-dry. The average recoveries of AAPBs in sediment sample were 82% - 95%. Using this method, AAPBs were not detected in the sediment sample collected in port, Wakayama Shimotsu.



* : if necessary



* : if necessary

物質名	分析法フローチャート	備考
[(3-アルカンアミド-プロピル)(ジメチル)アンモニオ]アセタート (アルカンアミドの炭素数が 10、12、14、16 又は 18 で、直鎖型のもの) 又は (Z)-{[3-(オクタデカ-9-エンアミド)プロピル](ジメチル)アンモニオ}アセタート 別名： アルキルアミドプロピルペタイン	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 100 mL] --> B[保存処理 95°C 1 Hr] B --> C[固相抽出 Sep-Pak PS2 容器洗い込み 精製水 5mL 3 mL/min] C --> D[洗浄 精製水 10 mL] D --> E[容器洗い込み メタノール 10 mL 55°C 15 分以上 ×2 回] E --> F[希釈 精製水 30 mL] F --> G[通水 Sep-Pak PS2 3 mL/min] G --> H[脱水 注射筒 空気 20 mL] H --> I[溶出 メタノール 10 mL] I --> J[定容 メタノール 10 mL] J --> K[LC/MS/MS-SRM ESI+] </pre> ※ [] 必要に応じて実施	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive 検出下限値： 【水質】 (ng/L) AAPB-C₁₀ 1.5 AAPB-C₁₂ 15 AAPB-C₁₄ 2.9 AAPB-C₁₆ 1.4 AAPB-C₁₈ 0.26 AAPB-C₁₈ 0.14 【底質】 (ng/g-dry) AAPB-C₁₀ 0.64 AAPB-C₁₂ 2.6 AAPB-C₁₄ 1.0 AAPB-C₁₆ 0.33 AAPB-C₁₈ 0.15 AAPB-C₁₈ 0.062 分析条件： 機器 LC：Agilent 1100series MS：API3200 カラム L-column 2 ODS, 2.1×150 mm, 3 µm

物質名	分析法フローチャート	備考
	【底質】 <pre> graph LR A[底質試料 湿泥 (乾泥 10 g 相当)] --> B[抽出 28%アンモニア水/メタノール(5:95) 30 mL 70°C 15 min] B --> C[遠心分離 3000 rpm 10 min (3 回目は 3000 rpm 20 min)] C -.-> B C -- 3 回 --> D[定容 メタノール 100 mL] D --> E[分取 2 mL] E --> F[希釈 精製水 3 mL] F --> G[クリーンアップ Oasis MCX 2 mL/min] G --> H[洗浄 精製水 2 mL ギ酸/精製水(2:98) 5 mL メタノール 10 mL] H --> I[溶出 28%アンモニア水/メタノール (5:95) 10 mL] I --> J[希釈 メタノール 5 mL 遠沈管洗いこみ 精製水 22.5 mL] J --> K[クリーンアップ Sep-pak PS2 2 mL/min] K --> L[洗浄 精製水 5 mL] L --> M[脱水 注射筒 空気 20 mL] M --> N[溶出 メタノール 10 mL] N --> O[定容 メタノール 10 mL] O --> P[LC/MS/MS-SRM ESI(+)] </pre> ※ 抽出 必要に応じて実施	

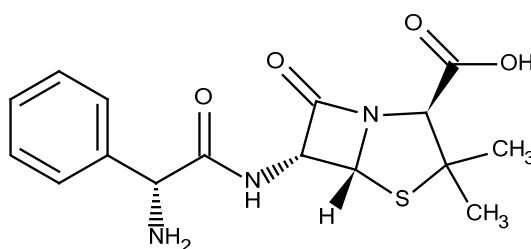
アンピシリン

Ampicillin

別名 (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(*R*)-2-アミノ-2-フェニルアセトアミド]-3,3-ジメチル-7-オキソ-4-チア-1-アザビシクロ[3.2.0]ヘプタン-2-カルボン酸

(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(*R*)-2-Amino-2-phenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid

【対象物質の構造】



CAS 番号：69-53-4

分子式：C₁₆H₁₉N₃O₄S

【物理化学的性状】

物質名	アンピシリン
分子量（平均分子量）	349.40
分子量（モノアイソトピック質量）	349.1096
比重（g/cm ³ ）	—
沸点（°C）	—
融点（°C）	198 ¹⁾
蒸気圧（hPa）	3.79×10 ⁻¹³ (25°C、推定値) ¹⁾
水溶解度（mg/L）	10100 (21°C) ¹⁾
ヘンリー定数（atm·m ³ /mol）	2.39×10 ⁻¹⁷ (25°C、推定値) ¹⁾
log P _{ow}	1.35 ¹⁾
pKa	2.5、7.3 (23°C) ²⁾

【毒性、用途】

〔毒性〕²⁾

〔実験動物に対する急性毒性情報〕 ラット（経口）LD₅₀:10 g/kg

〔用途〕³⁾

医薬（抗生物質製剤）、動物薬（抗菌剤）

出典:

- 1) U.S.EPA, Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ version 4.11
- 2) U.S.National Center for Biotechnology Information's PubChem system
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構:化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

§1 分 析 法

(1) 分析法の概要

水質試料にギ酸、塩化ナトリウム及びサロゲート内標準を添加後、固相カートリッジに通水する。固相カートリッジを洗浄、脱水後、アセトニトリル/精製水(9:1)で溶出し、濃縮後、精製水で定容して LC/MS/MS-SRM(ESI+)で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

アンピシリン	: 富士フイルム和光純薬工業製 高速液体クロマトグラフ用（純度 99.2%）
アンピシリン- <i>d</i> ₅ （注 1）	: TLC Pharmaceutical Standard (98.7 atom%D)
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬工業製 LC/MS 用
塩化ナトリウム	: 富士フイルム和光純薬工業製 残留農薬・PCB 測定用
精製水	: 超純水製造装置（Merck 製）Milli-Q Integral で製造した Milli-Q 水
ギ酸	: 富士フイルム和光純薬工業製 LC/MS 用
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis HLB Plus (225 mg)

【標準液の調製】

〔標準原液〕（注 2）

アンピシリン 10.0 mg を正確に量り取り、アセトニトリル/精製水(2:3)で 100 mL とし、100 µg/mL の標準原液を調製する。ガラス製の器具・容器を用いる。

〔サロゲート内標準液〕

アンピシリン-*d*₅ 1.0 mg を正確に量り取り、アセトニトリル/精製水(2:3)で 10 mL とし、100 µg/mL のサロゲート内標準原液を調製する。これを精製水で正確に希釈し、0.10 µg/mL のサロゲート内標準液を調製する。ガラス製の器具・容器を用いる。

〔検量線用標準液〕（注 2）

標準原液を精製水で順次希釈し、0.020～10 ng/mL の検量線用標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液に、サロゲート内標準（アンピシリン-*d*₅）の濃度が 1.0 ng/mL となるように添加する。PP 製の器具・容器を用いる。

【器具】（注 2）、（注 3）

不活性処理されていないガラス製器具・容器を、低濃度のアンピシリンに対して長時間使用した場合、アンピシリンの濃度が低下する恐れがある。標準原液・サロゲート内標準液調製用の器具・容器、試料分取用メスシリンダー及び脱水用の注射筒以外は、PP 製の器具・容器を用いる。アンピシリンと接しない、移動相、シリンジ洗浄液の調製については、ガラス製の器具・容器を用いる。

固相抽出送液装置	: GL Sciences 製 AQUA Loader II
窒素ガス吹付濃縮装置	: Biotage 製 Turbo Vap
ねじ口ポリ瓶	: ポリプロピレン(PP)製又はポリエチレン(PE)製（試料採取・保存・分注用）
メスフラスコ	: ガラス製、100 mL（標準原液調製用） 及び 10 mL（サロゲート内標準液調製用）
メスシリンダー	: ガラス製、100 mL（試料分取用）
遠沈管	: PP 製、15 mL
マイクロピペットチップ	: PP 製、10-100 µL、100-1000 µL
LC オートサンプラー用バイアル	: PP 製
注射筒	: ガラス製、10 mL

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】（注 2）、（注 4）

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）の「試料の採取及び検体の調製等」に従って採取する。試料容器には、ねじ口ポリ瓶（ポリプロピレン(PP)製またはポリエチレン(PE)製）を用いる。

試料は採取後、速やかに（試料採取の翌日までに）試料 1 L に対して 1 mL の割合でギ酸を添加し、混和後、冷暗所に保管する。

【試料の前処理及び試験液の調製】（注 2）、（注 4）

水質試料 100 mL にギ酸 0.1 mL（試料保存時に添加している場合は、この時点では添加しない）、塩化ナトリウム 3 g（海水には添加しない）及び 0.10 µg/mL サロゲート内標準液 10 µL を添加し、混和した後、あらかじめコンディショニングした（注 5）固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に 10 mL/min の流速で通水する。通水後、固相カートリッジを 0.1%ギ酸 5 mL で洗浄し、注射筒で空気を 10 mL 通気して、固相中の水分を除去する。捕集した対象物質をアセトニトリル/精製水(9:1) 5 mL で溶出し、窒素気流下で 0.5 mL 以下になるまで濃縮した後、精製水で 1 mL に定容したものを試験液とする。試料分取用メスシリンダー及び脱水用の注射筒以外は、PP 製の器具・容器を用いる。

【空試験液の調製】

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

【測定】

〔LC/MS 測定条件〕（注 6）

〔LC 条件〕

LC 機種	： 島津製作所製 SHIMADZU LC-20A Series		
カラム	： YMC 製 YMC-Triart C18, 150 mm × 2.1 mm, 3 µm		
移動相	： A: 0.1%ギ酸水溶液 B:アセトニトリル		
	0→ 1 min	A: 95	B: 5
	1→11 min	A: 95→5	B: 5→ 95 linear gradient
	11→16 min	A: 5	B: 95
	16→25 min	A: 95	B: 5

流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 5 µL
シール洗浄液	: メタノール/精製水(1:1)
シリンジ洗浄液	: ギ酸/精製水/メタノール(1:99:900)

[MS 条件]

MS 機種	: AB Sciex 製 API4000 Qtrap	
イオン化法	: ESI-Positive	
ターボガス温度 (TEM)	: 500°C	
カーテングス (CUR)	: 10 psi	
イオンスプレー電圧 (IS)	: 5500 V	
ネブライザーガス (GS1)	: 80 psi	
ターボガス (GS2)	: 80 psi	
コリジョンガス (CAD)	: 7	
測定モード	: SRM	
モニターイオン	: アンピシリン	m/z 350.2 > 105.9 (定量用)
		m/z 350.2 > 192.0 (確認用)
	: アンピシリン- d_5	m/z 355.2 > 110.9
ドリフト電圧 (DP)	: アンピシリン	61 V (定量用)
		61 V (確認用)
	: アンピシリン- d_5	61 V
コリジョン電圧 (CE)	: アンピシリン	35 V (定量用)
		23 V (確認用)
	: アンピシリン- d_5	23 V

[検量線]

検量線用標準液 5 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

[定量]

試験液 5 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の面積比から、検出量を求める。

[濃度の算出]

アンピシリンの試料水中濃度 C (ng/L) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R ：検量線から求めたサロゲート内標準物質濃度に対する対象物質濃度の比

Q ：試料中に添加したサロゲート内標準物質の量 (ng)

(添加するサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (μL))

V ：試料の分取量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 1.0 \text{ (ng)}$$

(添加サロゲート内標準液の濃度 (0.10 ng/μL) × 添加サロゲート内標準液の容量 (10 μL))

$$V = 0.1 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 10 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS の IDL を表 1 に示す (注 7)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
アンピシリン	0.025	0.10	1.0	0.000049

〔分析方法における検出下限値 (MDL)及び定量下限値 (MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 8)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料水	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
アンピシリン	海水	0.10	1.0	0.00012	0.00030

注 解

- (注1) 同等の他社製品を使用する場合は、ジアステレオマーの混合物でないことを確認する。「Mixture of Diastereomers」という表記が無い商品でも、ジアステレオマー混合物の可能性があるため、LC/MS/MS で1本のピークになることを確認すること。
- (注2) アンピシリンを含むペニシリン系抗生物質は、メタノールが存在するとメタノール付加体を形成する¹⁾。そのため、容器・器具の洗浄にはメタノールを使用しないか、使用したとしても残存しないようにすること。
- (注3) マイクロピペットを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注4) 保存性試験の結果、試料採取後、速やかに（試料採取の翌日までに）試料 1 L に対し 1 mL の割合でギ酸を添加することで、少なくとも 7 日間は保存可能である。
- (注5) 固相カートリッジは使用直前にアセトニトリル及び精製水それぞれ 5 mL でコンディショニングを行う。
- (注6) LC/MS の条件は、本測定に使用した機種（AB Sciex 製 API4000 Qtrap）特有のものである。

(注7) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 3 のとおり算出した。また、図 1 に IDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	アンピシリン
試料量 (L)	0.10
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.020
注入量 (pg)	0.10
装置注入量 (μL)	5.0
結果 1 (pg)	0.0933
結果 2 (pg)	0.0971
結果 3 (pg)	0.104
結果 4 (pg)	0.106
結果 5 (pg)	0.0890
結果 6 (pg)	0.104
結果 7 (pg)	0.101
平均値 (pg)	0.09920
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.00631
IDL (pg)*	0.025
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.049
S/N 比	12
CV (%)	6.4

*:IDL= $t(n-1,0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

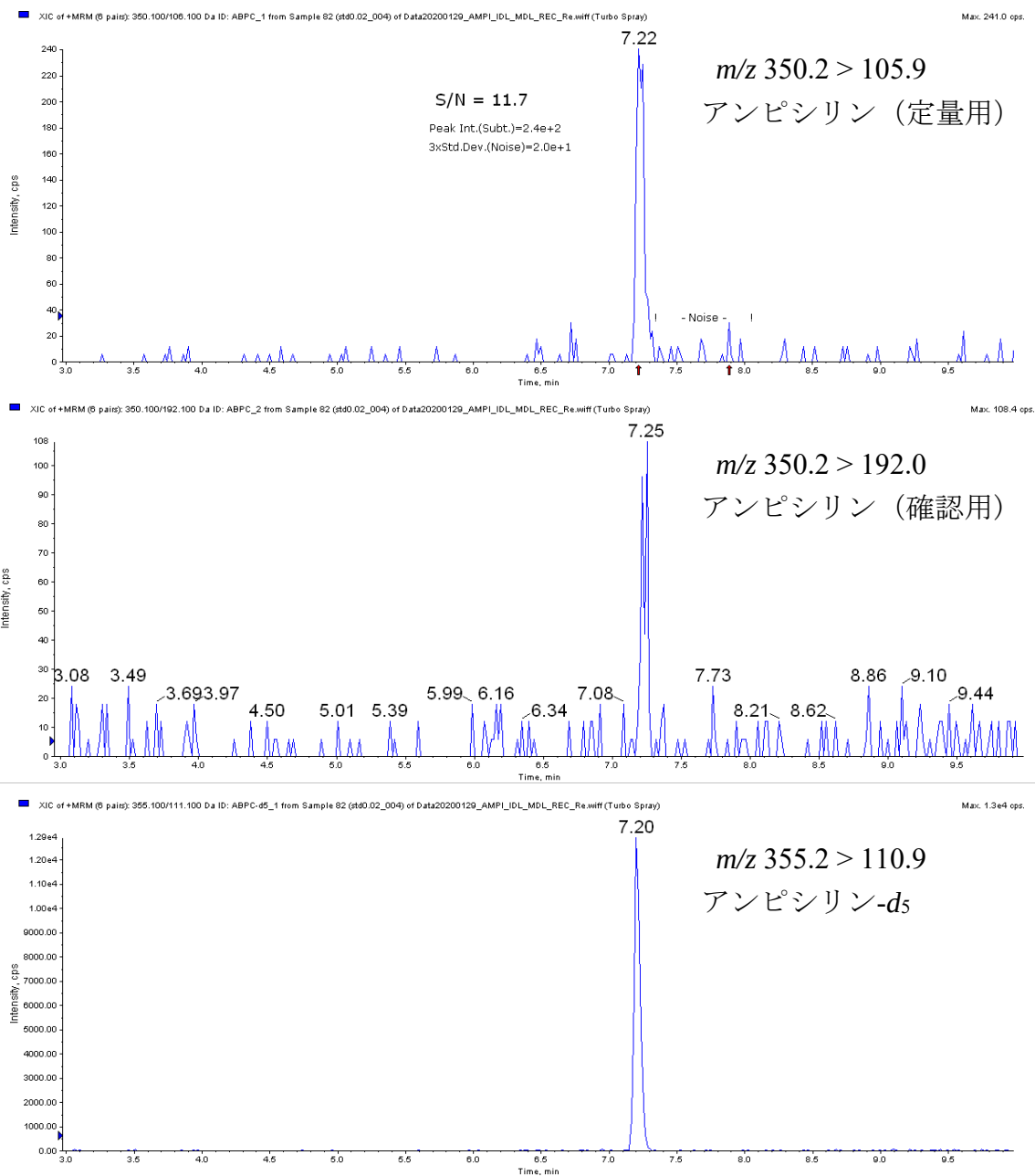


図1 IDL 測定時の SRM クロマトグラム
 (アンピシリン : 0.020 ng/mL、アンピシリン-d5 : 1.0 ng/mL)

(注8) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 4 のとおり算出した。また、図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) *1

物質名	アンピシリン	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)
試料	海水	-	
試料量 (L)	0.10	-	
標準添加量 (ng)	0.030	-	
試料換算濃度 (ng/L)	0.30	-	
最終液量 (mL)	1.0	-	
注入液濃度 (ng/mL)	0.030	-	
装置注入量 (μL)	5.0	-	
操作ブランク平均 (ng/L)*2	< 0.12	-	94
無添加平均 (ng/L)*3	< 0.12	-	94
結果 1 (ng/L)	0.357	118	98
結果 2 (ng/L)	0.340	112	79
結果 3 (ng/L)	0.310	102	93
結果 4 (ng/L)	0.269	88	93
結果 5 (ng/L)	0.299	98	94
結果 6 (ng/L)	0.344	113	90
結果 7 (ng/L)	0.323	106	95
平均値 (ng/L)	0.3203	105.3	91.7
標準偏差 (σ_{n-1}) (ng/L)	0.0303		
MDL (ng/L)*4	0.12		
MQL (ng/L)*5	0.30		
S/N 比	9.2		
CV (%)	9.4		

*1: 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2: 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*3: 無添加試料の平均濃度 (n=2)

*4: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

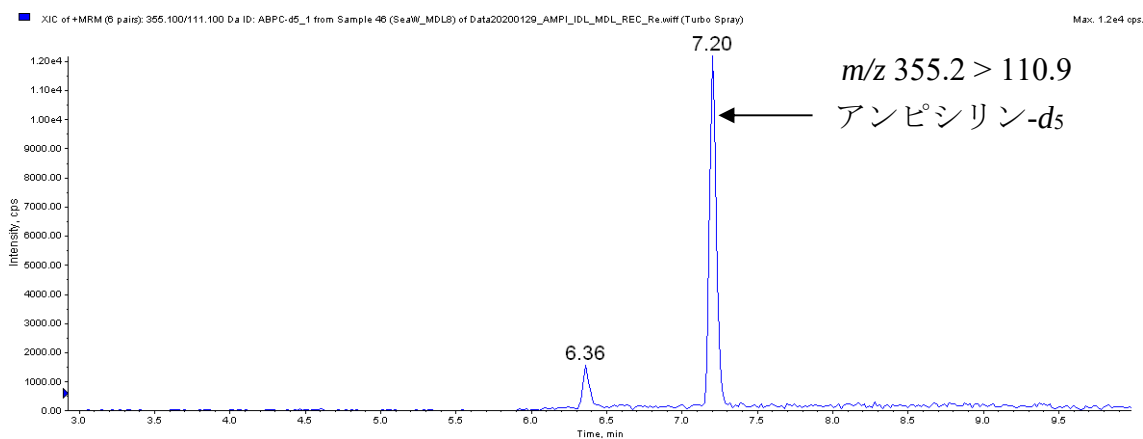
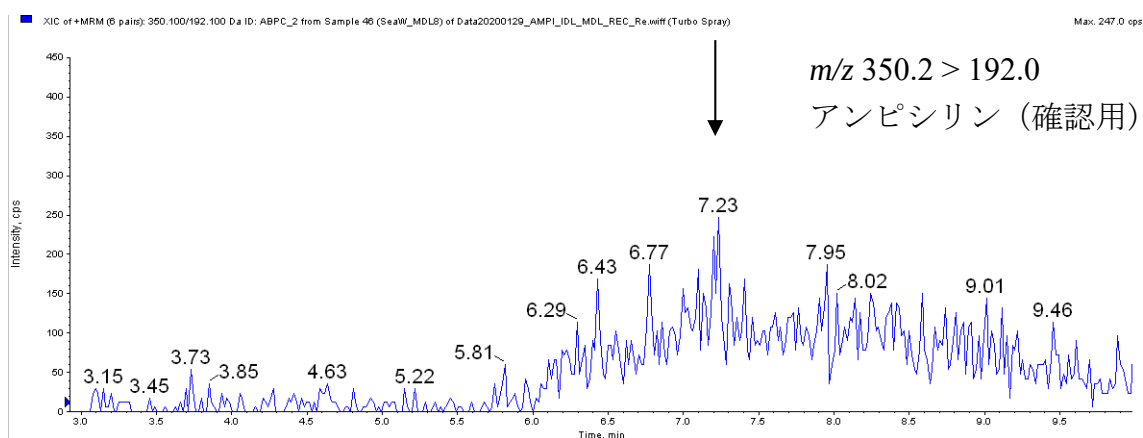
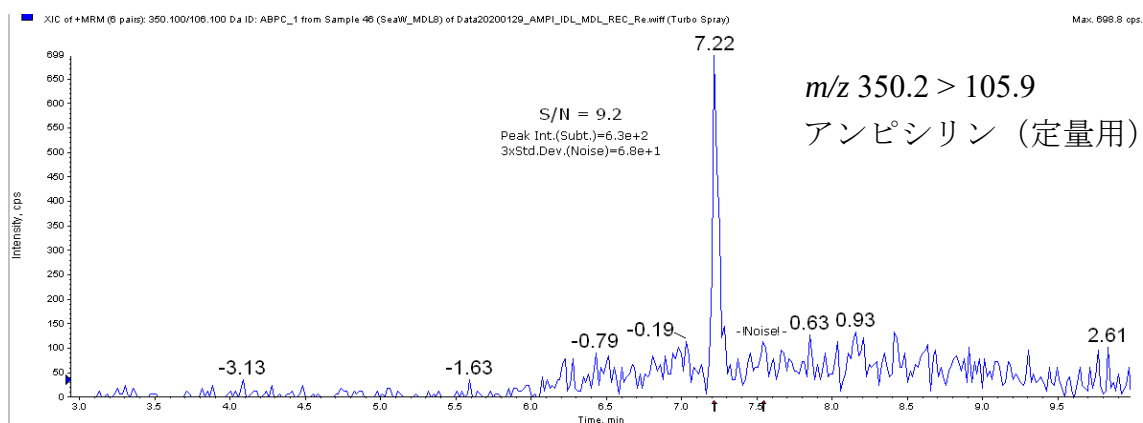


図2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(河川水 アンピシリン 0.030 ng 添加)

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

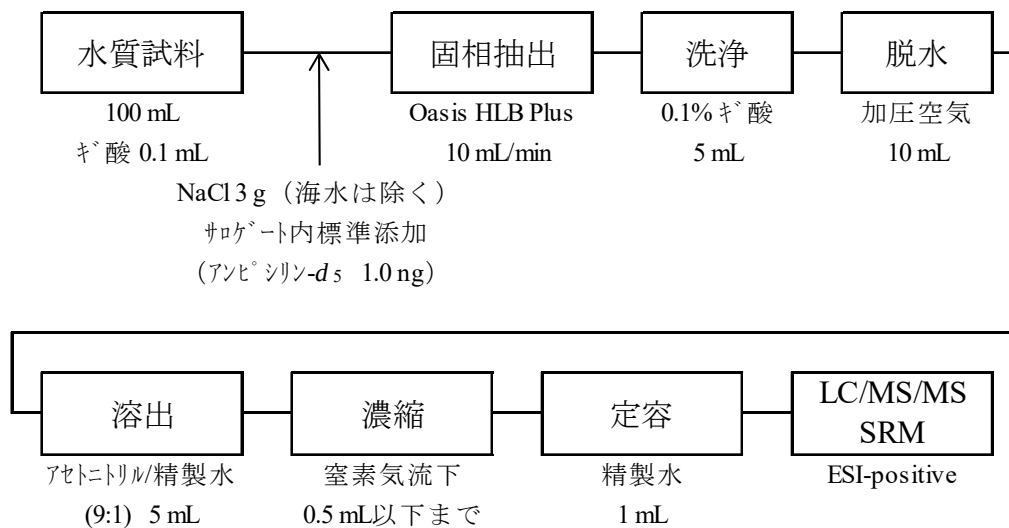


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線作成用データを表 5 に、検量線を図 4 に示す。

表 5 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s)	サロゲート内標準(A _{is})	
		【アンピシリン】 m/z 350.2 > 105.9	【アンピシリン-d ₅ 】 m/z 355.2 > 110.9	
0.000	0.000	0	41686	0.0000
0.020	0.020	1199	44006	0.0272
0.050	0.050	2875	44130	0.0651
0.10	0.10	5143	42925	0.120
0.20	0.20	10917	43609	0.250
0.50	0.50	27271	43564	0.626
1.0	1.0	53638	43664	1.23
2.0	2.0	110576	43042	2.57
5.0	5.0	267255	42303	6.32
10	10	546714	42104	13.0

C_{is}*:サロゲート内標準濃度 1.0 ng/mL

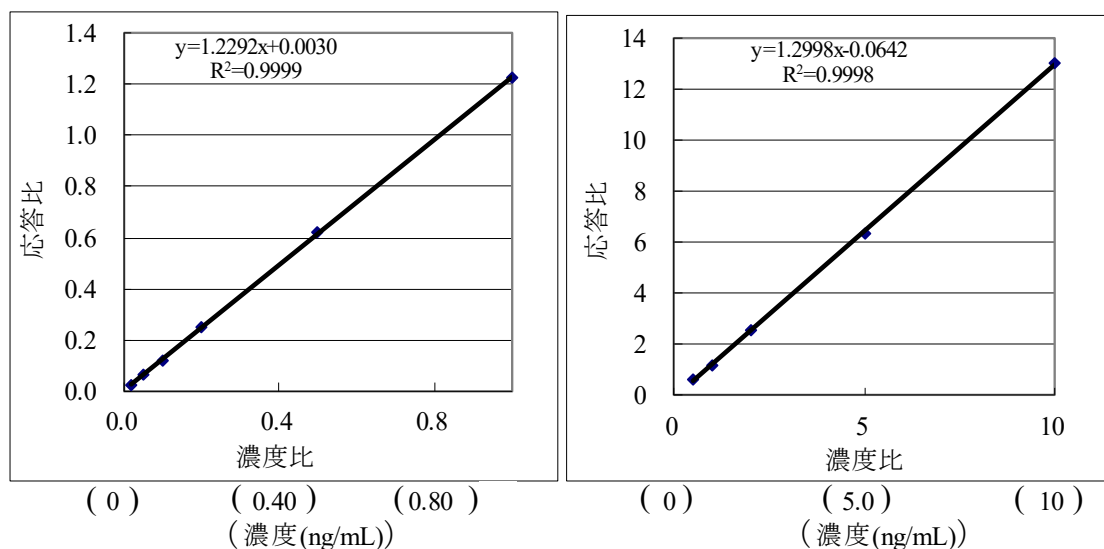


図 4 アンピシリンの検量線

(左図：低濃度 0.020～1.0 ng/mL、右図：高濃度 0.50～10 ng/mL、
サロゲート内標準：1.0 ng/mL)

[クロマトグラム]

標準液の SRM クロマトグラムを図 5 に示す。

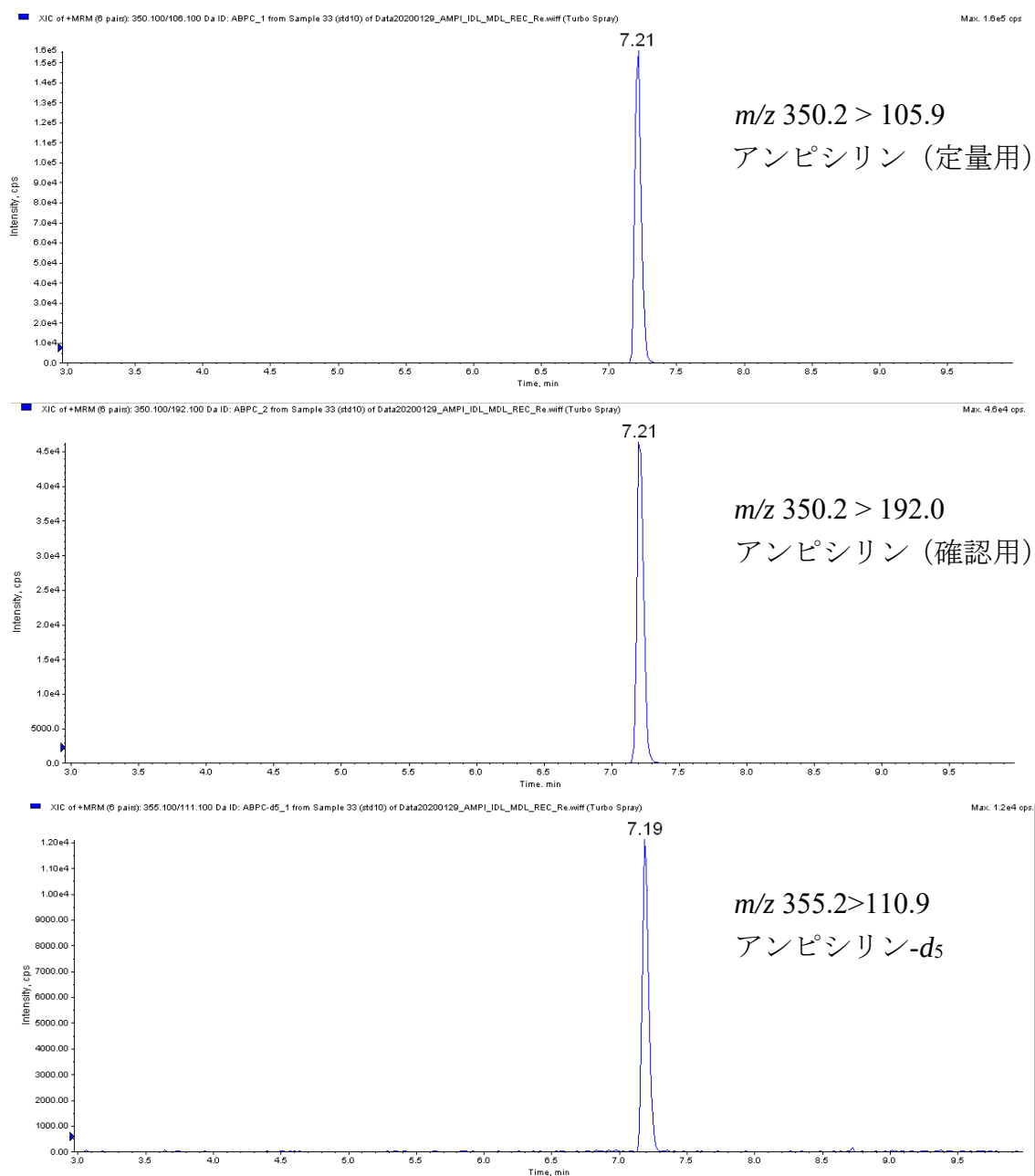


図 5 標準液の SRM クロマトグラム
(アンピシリン : 10 ng/mL、アンピシリン-d₅ : 1.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

アンピシリン及びアンピシリン- d_5 のマススペクトル並びにプレカーサーイオンに対するプロダクトイオンを各々図 6-1～6-2 に示す。

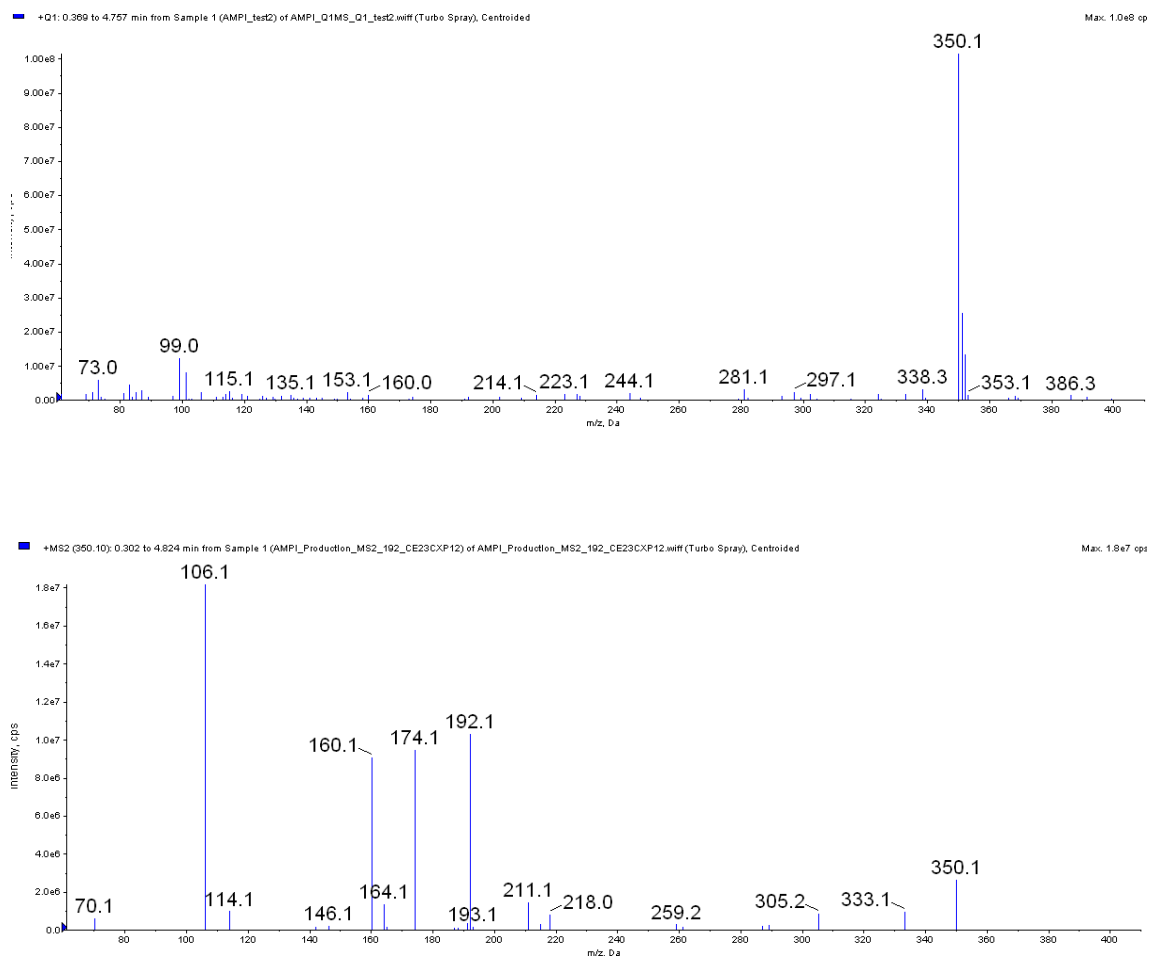


図 6-1 アンピシリンのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 350.1 に対するプロダクトイオン（下図）

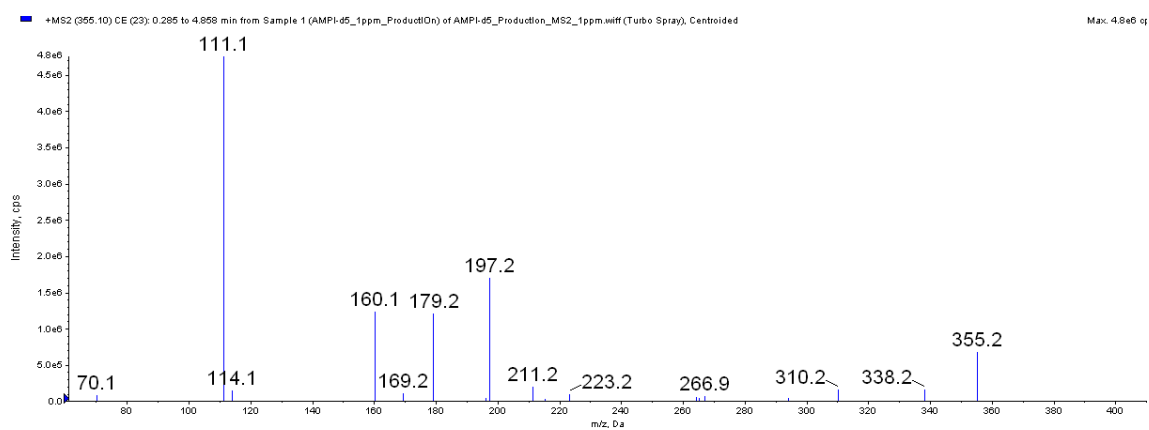
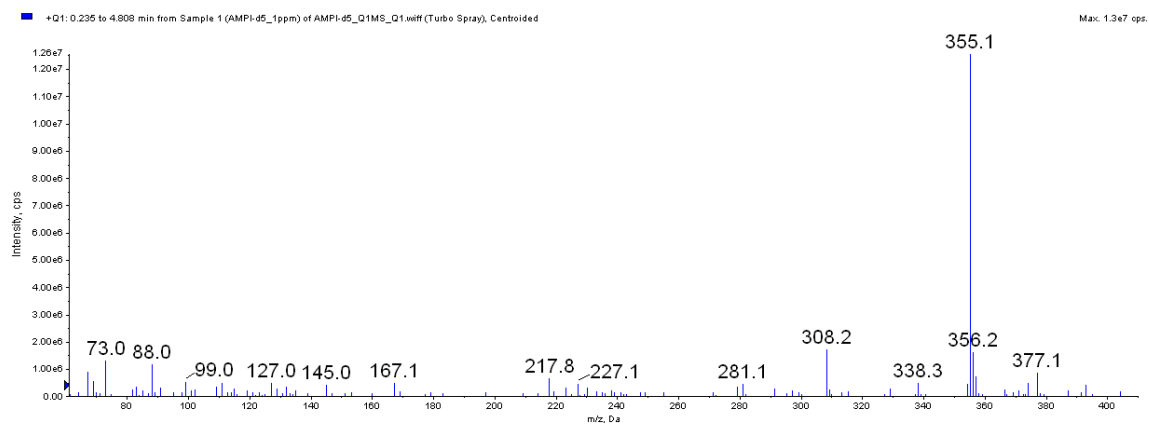


図 6-2 アンピシリン- d_5 のマススペクトル (上図) 及びプレカーサーイオン m/z 355.1 に対するプロダクトイオン (下図)

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験結果を表 6 に、クロマトグラムを図 7 に示す。

表 6 操作ブランクの試験結果

物質名	試験数	検出濃度 (ng/L)
アンピシリン	2	< 0.12

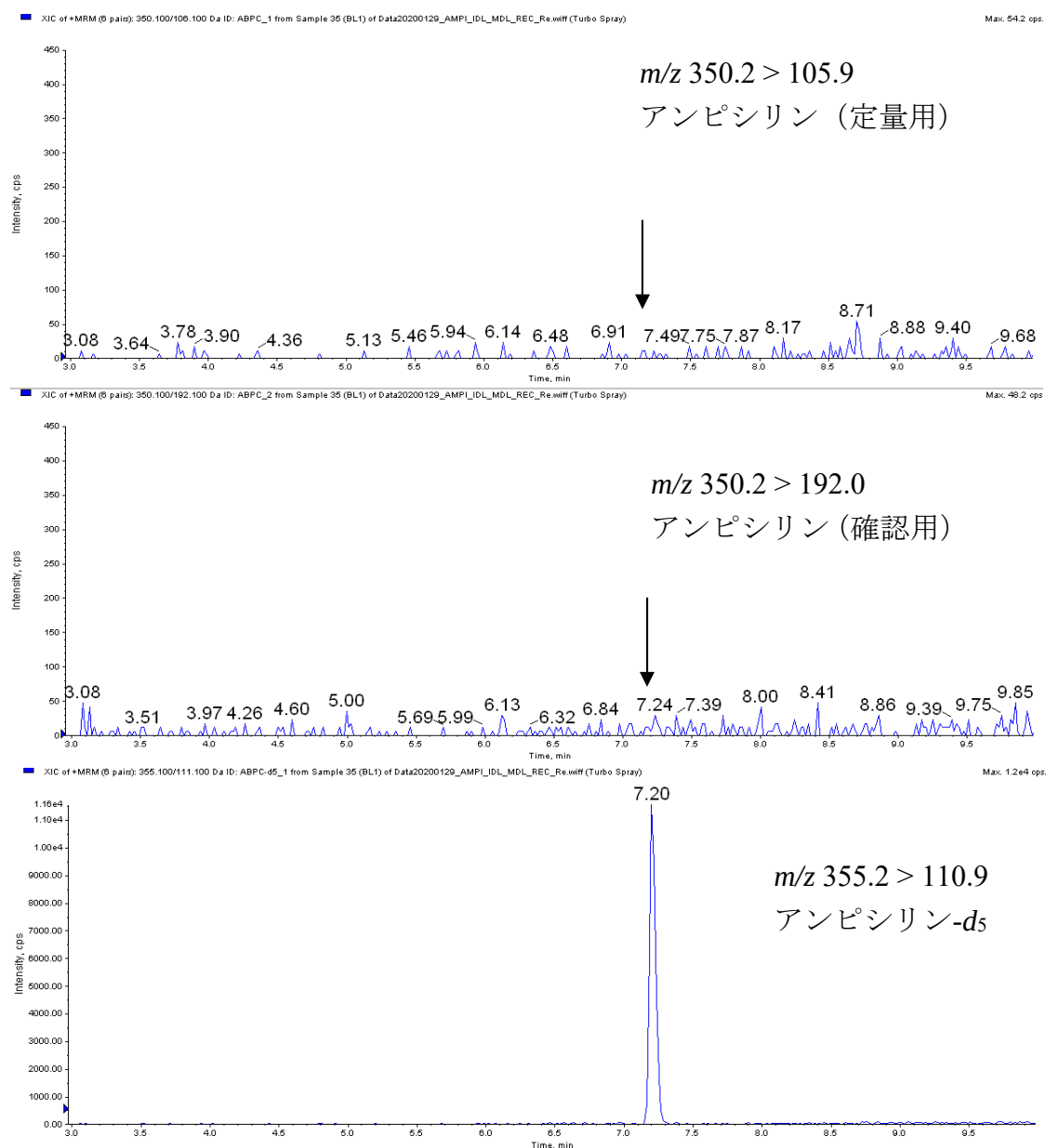


図 7 操作ブランク（精製水 100 mL）の SRM クロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水、海水への添加回収試験結果を表 7 に、クロマトグラムを図 8-1、図 8-2、図 9-1、図 9-2 に示す。

表 7 添加回収試験結果

物質名	試料	試料 量 (L)	試 験 数	添加 量 (ng)	検出 濃度* (ng/L)	回収 率* (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
アンピシリン	河川水	0.10	2	0	< 0.12	-	-	90
		0.10	5	0.30	2.93	98	4.7	87
	海水	0.10	2	0	< 0.12	-	-	94
		0.10	7	0.030	0.32	105	9.4	92
		0.10	2	0.30	2.68	89	-	96

*：検出濃度及び回収率はサロゲート法により補正した値

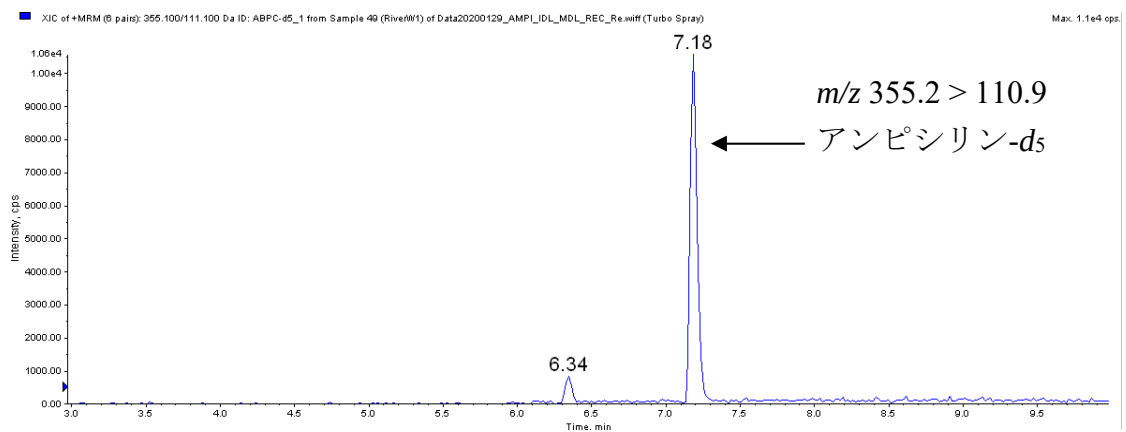
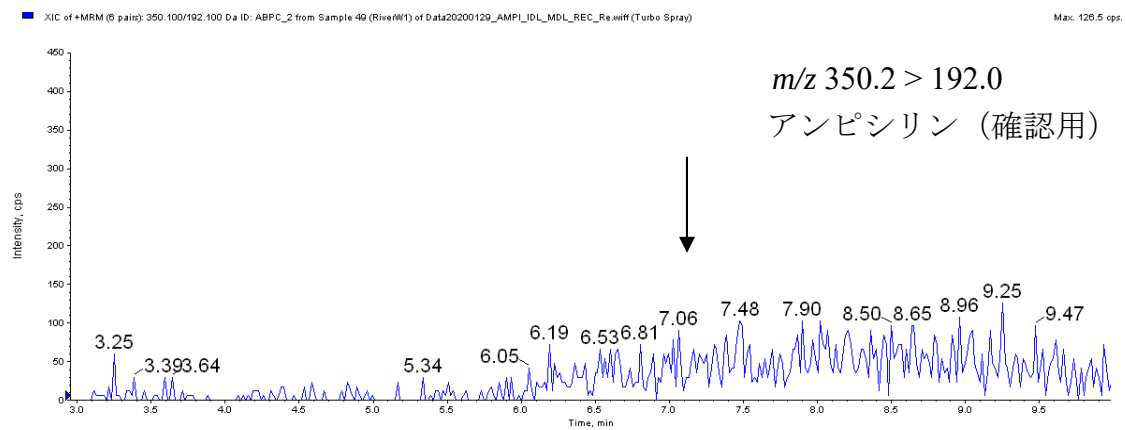
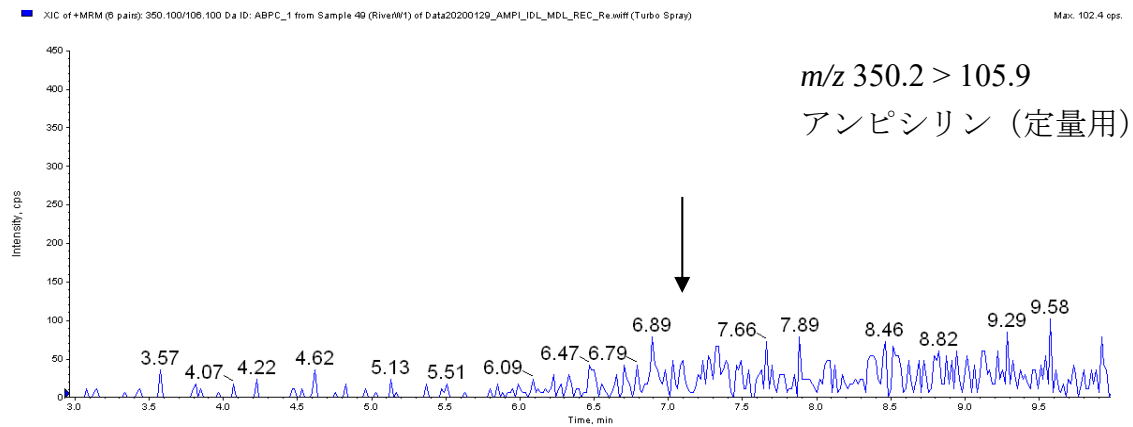


図 8-1 添加回収試験 (河川水 100 mL) の SRM クロマトグラム
(無添加試料)

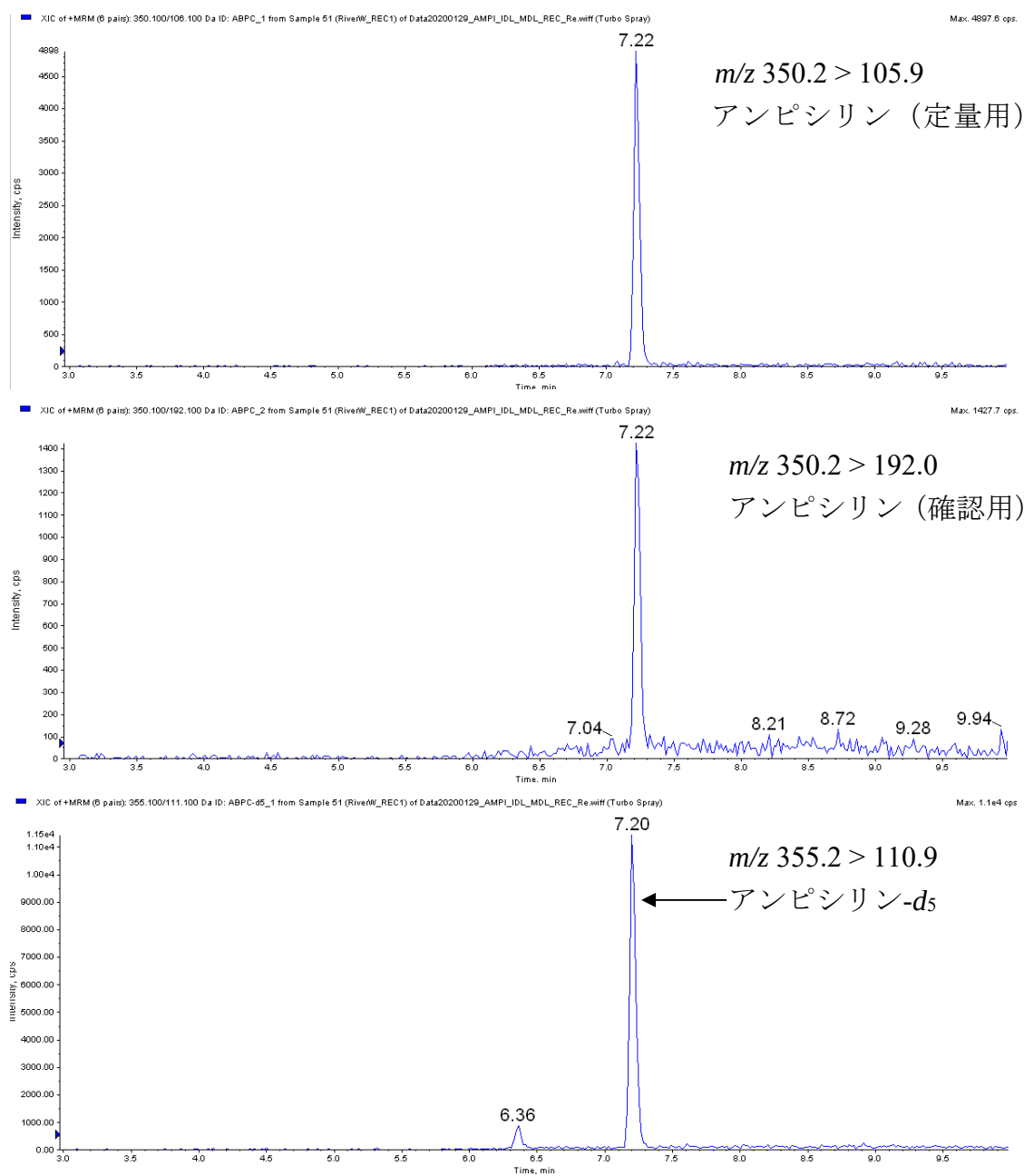


図 8-2 添加回収試験 (河川水 100 mL) の SRM クロマトグラム
(添加試料 0.30 ng)

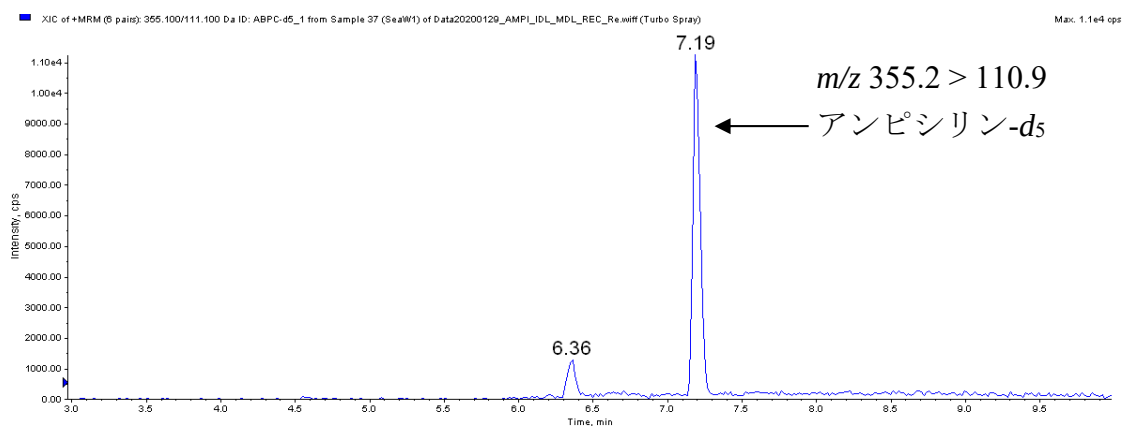
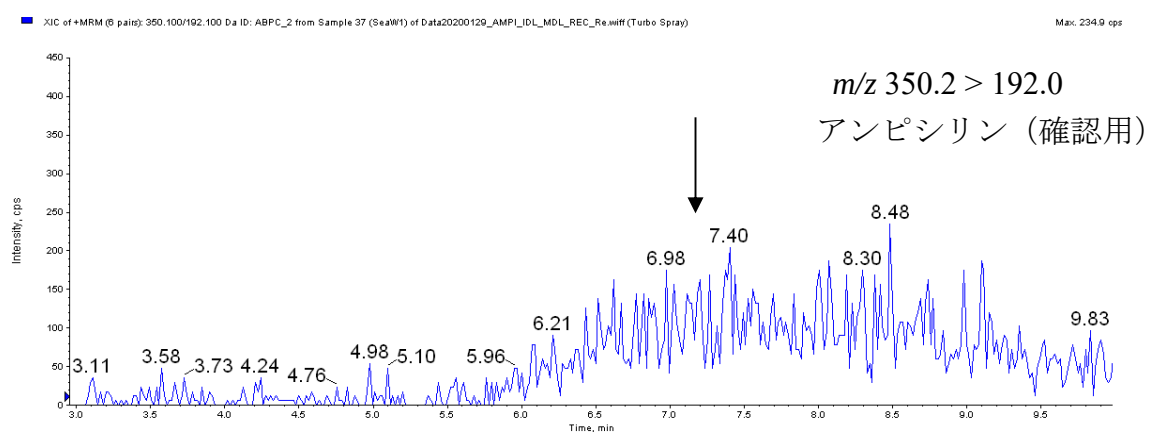
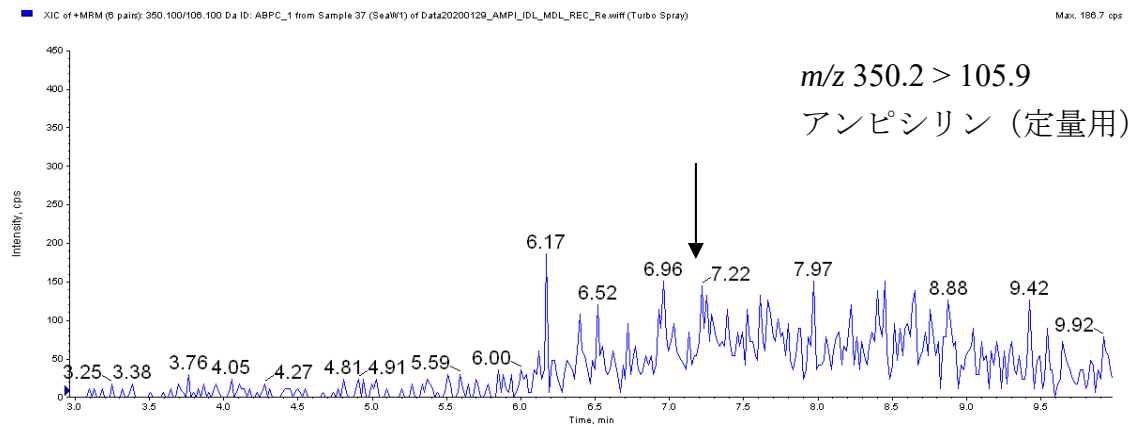


図 9-1 添加回収試験 (海水 100 mL) の SRM クロマトグラム
(無添加試料)

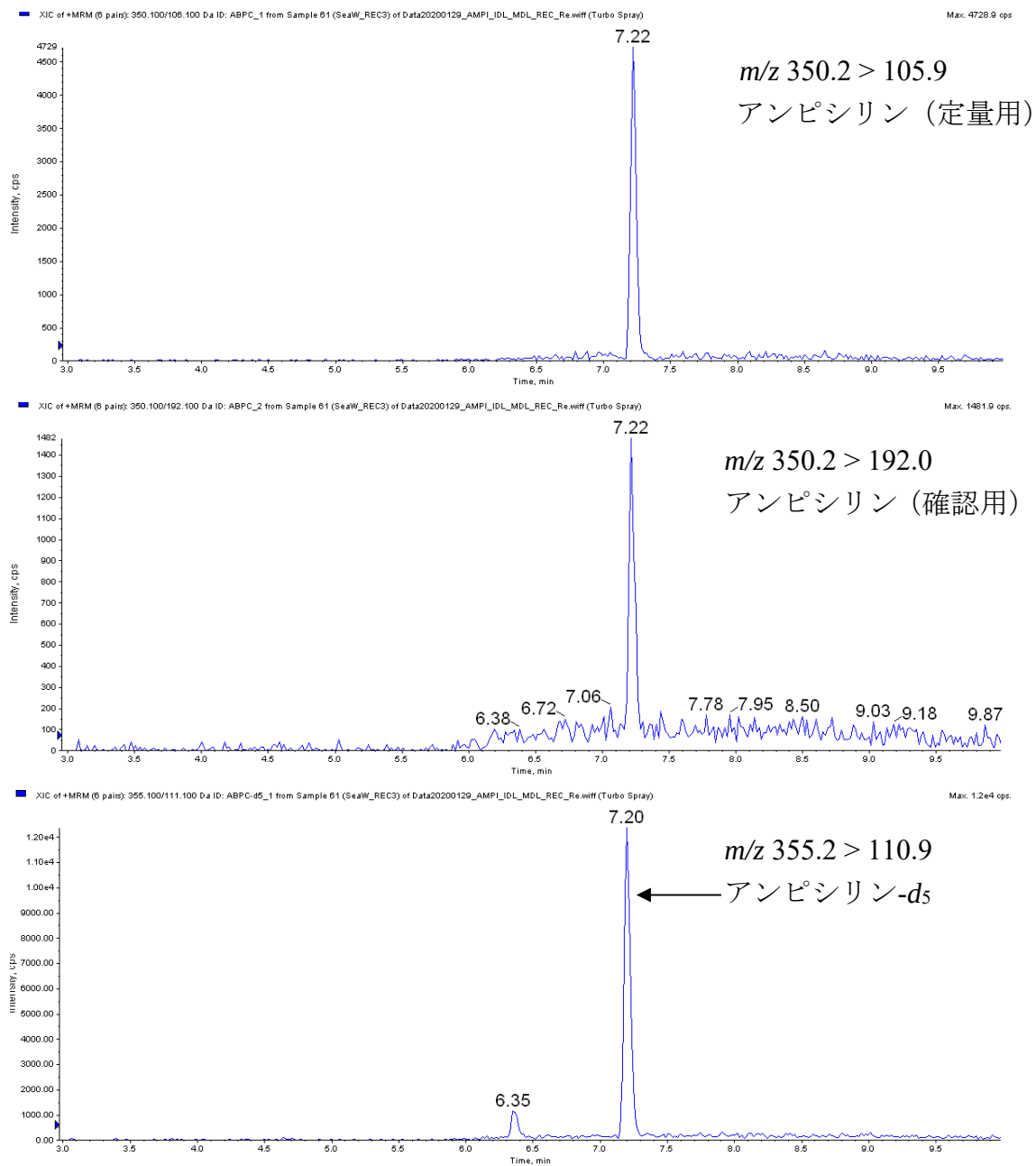


図 9-2 添加回収試験 (海水 100 mL) の SRM クロマトグラム
(添加試料 0.30 ng)

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 8 に示す。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度* ¹ (ng/mL) (残存率(%)* ²)		
				1 時間放置後	7 日間放置後	
					暗所	明所
アンピシリン	5	2	0.30	0.303 (101)	0.238 (79)	-
	7	2	0.30	0.305 (102)	0.052 (17)	0.135 (45)
	9	2	0.30	0.271 (90)	0.000 (0)	-

*1：検出濃度はサロゲート法により補正した値

*2：残存率(%)は調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

試料、試験液及び標準液の保存性試験結果を表 9 に示す。試料については、試料保存時にギ酸を添加した場合と、ギ酸を添加していない場合を比較した。保存時にギ酸を添加しなかった試料については、試験溶液の調製開始時に試料 100 mL に対して 0.1 mL ギ酸を添加した。それぞれ、試料保存開始時にアンピシリンを添加した水質試料を、冷蔵保存した後、1、3 及び 7 日後に【試料の前処理及び試験液の調製】に従って処理した試験液を測定した。

その結果、試料については、保存時にギ酸を添加することで少なくとも 7 日間は保存可能である。ギ酸は、試料採取の翌日までに添加することとした。

表 9 保存性試験結果

試料		調製濃度 (ng/mL) * ¹	検出濃度* ² (ng/mL) (残存率(%)* ³)				
			1 日間	3 日間	7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	保存時 ギ酸無添加	0.0031	0.0031 (100)	0.0021 (68)	0.0012 (39)	-	-
	保存時 ギ酸添加	0.0031	0.0033 (106)	0.0034 (110)	0.0031 (100)	-	-
	試験液	0.30	0.29 (97)		0.23 (77)	0.19 (63)	-
海水	保存時 ギ酸無添加	0.0031	0.0031 (100)	0.0021 (68)	0.0016 (52)	-	-
	保存時 ギ酸添加	0.0031	0.0029 (94)	0.0030 (100)	0.0028 (90)	-	-
	試験液	0.30	0.27 (90)		0.22 (73)	0.21 (70)	-
標準液	MDL の 10 倍程度	0.20			0.21 (104)	0.19 (95)	0.21 (104)
	検量線の最高濃度	10			9.7 (97)	9.6 (96)	10 (100)

*1：環境試料については調製当日の検出濃度

*2：検出濃度のうち試料についてはサロゲート法により補正した値

*3：残存率(%)は調製濃度に対する検出濃度の割合

〔固相カートリッジの選定〕

固相カートリッジ選定のために、固相カートリッジへの保持および精製水の洗浄による溶出の程度を確認した。表 10 の各固相カートリッジにアンピシリン 500 ng 添加した精製水 5 mL を通水させ、精製水 5 mL で洗浄した。通過液および洗浄液の測定を行った。

その結果、Oasis HLB Plus と ENVI-Carb Plus が良好であった。一般的に使用される Oasis HLB Plus を用いて、固相抽出することとした。

表 10 固相カートリッジの選定結果

固相カートリッジ	保持の程度	精製水の洗浄による溶出の程度
Oasis HLB Plus (Waters)	保持	溶出せず
Sep-Pak Plus AC-2 (Waters)	一部保持せず	一部溶出
ENVI-Carb Plus (Merck (Supelco))	保持	溶出せず

〔固相カートリッジからの溶出条件の検討〕

固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)を用いて固相抽出を行う際の溶出条件の検討を行った。アンピシリン 500 ng 添加した精製水 5 mL を固相(Oasis HLB Plus)に通水させ、精製水 5 mL で洗浄、注射器で空気を 10 mL 通気して脱水後、表 11 の各溶出溶媒 5 mL ずつのフラクションで溶出させた。溶出液をシリンジスパイク法により測定し、得られた回収率を表 11 に示す。シリンジスパイク内標準は、アンピシリン-*d*₅を用いた。

その結果、どの溶出溶媒でも最初の 5 mL のフラクションで 80%以上の回収率が得られた。水分含量が多いと濃縮に時間がかかることを考慮し、溶出溶媒をアセトニトリル／精製水 (9:1)に、溶出溶媒量を 5 mL とした。

表 11 固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)からの溶出条件の検討結果

溶出溶媒	回収率(%)		
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL
アセトニトリル/精製水 (9:1)	83	0	0
アセトニトリル/精製水 (8:2)	88	1	0
アセトニトリル/精製水 (5:5)	86	0	0

〔塩析効果の検討〕

アンピシリン 100 ng 及びアンピシリン-*d*₅ 100 ng を添加した精製水、河川水及び海水各 100 mL を固相(Oasis HLB Plus)に通水、精製水 5 mL で洗浄、アセトニトリル／精製水(9:1) 5 mL で溶出、0.5 mL 以下まで濃縮、精製水で 1 mL に定容した添加回収試験結果を表 12-1 に示す。

その結果、精製水及び河川水試料と比較して海水試料の回収率が良かった。

そこで、塩析効果を確認するために、添加する塩化ナトリウムの量を検討した。精製水 100 mL に対して、塩化ナトリウム 0 g、1 g、3 g、10 g を溶解し、同様の固相抽出後、得られた各試験液を測定した。得られた添加回収試験結果を表 12-2 に示す。

その結果、塩化ナトリウム無添加に比べて添加した試料の回収率が高く、塩析効果が確認できた。試験液に残存する塩化物イオン量を低濃度にするため、塩化ナトリウムの添加量を 3 g（海水の場合は除く）に決定した。

表 12-1 添加回収試験結果

試料名	回収率 (%)
精製水	51
河川水	63
海水	76

表 12-2 塩析による添加回収試験結果（試料：精製水 100 mL）

塩化ナトリウム (g)	回収率 (%)
0	48
1	63
3	59
10	73

〔固相抽出時の試料の pH の影響〕

試料の pH が固相抽出時の保持に及ぼす影響を確認した。海水 100 mL にギ酸 0.1 mL を添加した試料液（約 pH 2.6）及び 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液をベースに 1%ギ酸若しくは 1%アンモニア水で pH 5、pH 7、pH 8 に調整した試料液に、アンピシリン 1 ng 及びアンピシリン-*ds* 1 ng を添加し、固相抽出後、得られた各試験液を測定した。得られた添加回収試験結果を表 13 に示す。

その結果、pH7 より下（酸性側）に試料の pH を調製すると回収率が向上した。試料の pH を迅速に酸性とするために試料 100 mL に対してギ酸 0.1 mL 添加（0.1%相当のギ酸）に決定した。また、固相の洗浄液についても液性を酸性に保持し、回収率を向上させる観点から、0.1%ギ酸に決定した。

表 13 海水試料(100 mL)の回収率に与える固相抽出時の試料の pH の影響

pH	回収率 (%)
約 2.6（ギ酸 0.1 mL 添加）	78
5	80
7	80
8	56

〔環境試料の分析〕

本法を用いて神戸市内の海水（神戸港）及び河川水（住吉川）を測定した結果、アンピシリンはいずれも検出されなかった(<0.12 ng/L)（図 8-1 及び図 9-1）。

【評価】

環境水中に含まれるアンピシリンの定量分析法を開発した。本法で用いた LC/MS/MS でのアンピシリンの IDL は 0.025 pg（試料換算濃度は 0.049 ng/L）であり、0.020～10 ng/mL の範囲で検量線の直線性が確認された。固相抽出法による試験液の調製を行う本法の MDL は 0.12 ng/L、MQL は 0.30 ng/L であった。河川水にアンピシリンを 0.30 ng、海水に 0.30 及び 0.030 ng 添加した時の回収率はそれぞれ 98%、105%及び 89%、サロゲート回収率は 87～90%（河川水）及び 92～96%（海水）であった。本法で神戸の河川水及び海水を測定したところ、アンピシリンはすべて検出されなかった(< 0.12 ng/L)。以上の結果から、本法は水質試料中に含まれるアンピシリンを 0.1 ng/L オーダーで検出できるものと判断される。

【参考文献】

- 1) 西村一彦、橋本諭、山口博美、藤井良昭、根本綾子、平間祐志：ペニシリン系抗生物質のメタノール付加体形成に関する研究，北海道衛生研究所所報，**64**, 17-21 (2014)

【担当者連絡先】

所属先名称：神戸市環境保健研究所

所属先住所：〒650-0046 神戸市中央区港島中町 4-6-5

TEL：078-302-6302、FAX：078-302-0894

担当者名：吉野 共広、八木 正博

E-mail：tomohiro_yoshino@office.city.kobe.lg.jp

masahiro_yagi@office.city.kobe.lg.jp

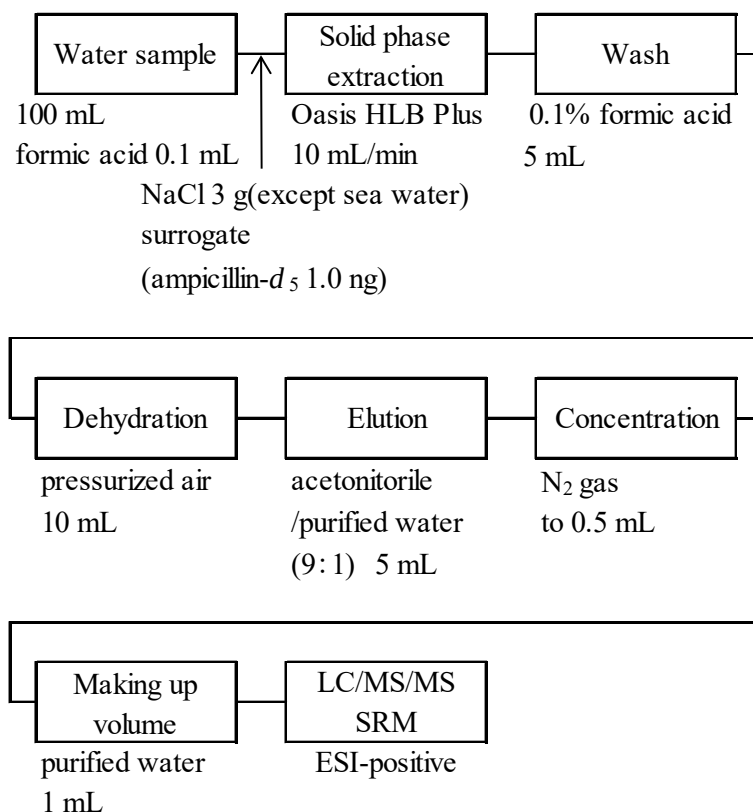
Ampicillin

This method provides a procedure for the quantitative determination of ampicillin in water samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring (LC/MS/MS-SRM).

After sampling, 0.1 mL of formic acid is added to a water sample (100 mL) by the next day, and then 3 g of NaCl is added to the sample (except sea water). The sample solution is spiked with 10 μ L of ampicillin-*d*₅ (surrogate, 0.10 ng/ μ L), and passed through a solid phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus) preconditioned with 5 mL of acetonitrile and 5 mL of purified water. The cartridge is washed with 5 mL of 0.1% formic acid water. The remaining solution is removed with a syringe. The analyte is eluted with 5 mL of acetonitrile/purified water (9:1). The eluate is evaporated to 0.5 mL under nitrogen gas, and made up to 1 mL with purified water. The solution is analyzed by LC/MS/MS-SRM (ESI positive).

The instrument detection limits (IDL) and the method detection limits (MDL) of ampicillin in water sample is 0.025 pg and 0.12 ng/L, respectively. The recoveries of ampicillin added to water samples (river and sea water) were 98%, 89–105%, respectively.

Using this method, ampicillin was not detected in river and sea water in Kobe city.



物質名	分析法フローチャート	備考
アンピシリン 別名： (2<i>S</i>,5<i>R</i>,6<i>R</i>)- 6-[(<i>R</i>)-2-ア ミノ-2-フ ェニルアセ トアミ ド]-3,3-ジ メチル-7- オキソ-4- チア-1-ア ザビシクロ [3.2.0]ヘプ タン-2-カ ルボン酸	【水質】 <pre> graph TD A["水試料 100 mL ギ酸 0.1 mL"] --> B["固相抽出 Oasis HLB Plus 10 mL/min NaCl 3 g (海水は除く) サロゲート内標準添加 (アンピシリン-d5 1.0 ng)"] B --> C["洗浄 0.1%ギ酸 5 mL"] C --> D["脱水 加圧空気 10 mL"] D --> E["溶出 アセトリル/精製水 (9:1) 5 mL"] E --> F["濃縮 窒素気流下 0.5 mL以下まで"] F --> G["定容 精製水 1 mL"] G --> H["LC/MS/MS SRM ESI-positive"] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive 検出下限値： 【水質】(ng/L) 0.12 分析条件： 機器 LC: 島津製作所製 LC-20A MS: AB Sciex 製 API4000 Qtrap カラム YMC 製 YMC-Triart C18 150 mm × 2.1 mm, 3 μm

クロフィブラート

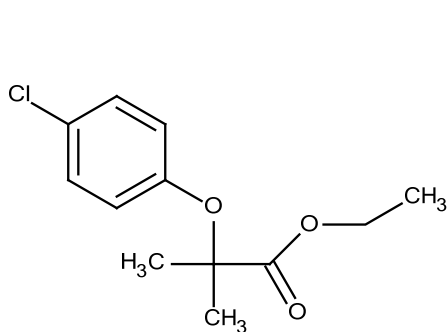
クロフィブリン酸

Clofibrate

Clofibric acid

同時分析可能な物質：フェノフィブラート、クリノフィブラート、ベザフィブラート

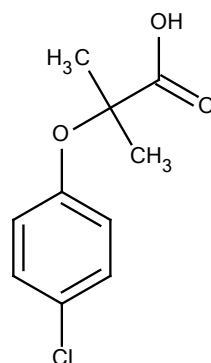
【対象物質の構造】



Clofibrate

CAS : 637-07-0

分子式 : C₁₂H₁₅ClO₃



Clofibric acid

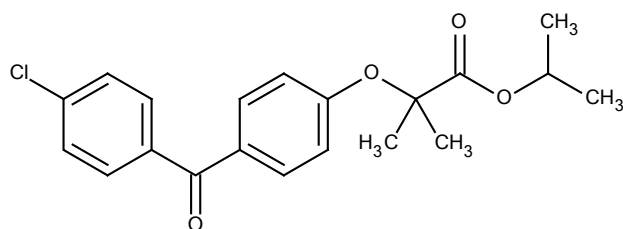
CAS : 882-09-7

分子式 : C₁₀H₁₁ClO₃

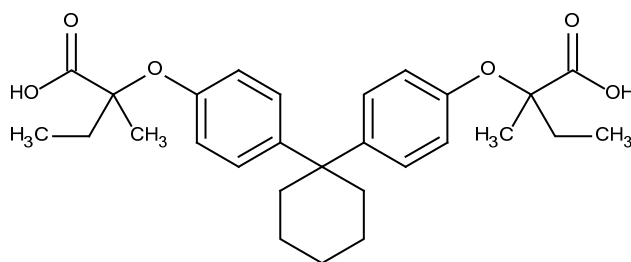
【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モライットビツク質量)	融点 (°C)	沸点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
クロフィブラート	242.72 (242.0709)		14-150 ¹⁾	不溶 ²⁾	
クロフィブリン酸	214.646 (214.0396)	118-119 ³⁾		583 ³⁾	2.57 ³⁾

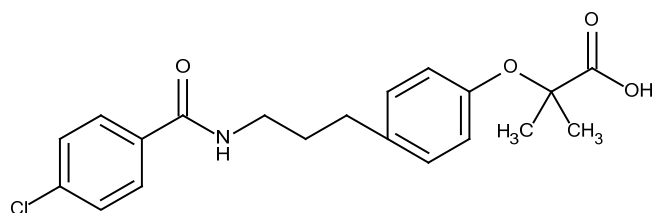
【同時分析物質の構造式】



フェノフィブラート



クリノフィブラート



ベザフィブラート

【毒性、用途等】

〔毒性〕

- ・クロフィブラート：データなし
- ・クロフィブリン酸：

ヒト TDLo : 260 mg/kg ⁴⁾

マウス LD₅₀ (腹腔内) : 290 mg/kg ⁵⁾

マウス LD₅₀ (経口) : 1170 mg/kg ⁶⁾

マウス LD₅₀ (皮下) : 683 mg/kg ⁷⁾

ラット LD₅₀ (腹腔内) : 727 mg/kg ⁸⁾

ラット LD₅₀ (経口) : 897 mg/kg ⁶⁾

ラット LD₅₀ (皮下) : 120 mg/kg ⁵⁾

〔用途〕

クロフィブラート：高脂質血症治療薬^{9), 10)}

クロフィブリン酸：クロフィブラート誘導体、高脂質血症治療薬¹¹⁾

出典：

- 1) Budavari, S. (ed.). The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, NJ: Merck and Co., Inc., 1989., p. 371
- 2) Osol, A. (ed.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1980., p. 801
- 3) TOXNET : <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/882-09-7>
- 4) Atherosclerosis Vol. 36, Pg. 159, 1980.
- 5) Pharmazie. Vol. 22, Pg. 167, 1967.
- 6) Arzneimittel-Forschung. Drug Research. Vol. 27, Pg. 1173, 1977.
- 7) Russian Pharmacology and Toxicology Vol. 33, Pg. 150, 1970.
- 8) Travaux de la Societe de Pharmacie de Montpellier. Vol. 34, Pg. 121, 1974.
- 9) 日本薬局方 クロフィブラートカプセル：
<https://pins.japic.or.jp/pdf/newPINS/00057584.pdf>
- 10) KEGG : https://www.kegg.jp/medicus-bin/japic_med?japic_code=00057584
- 11) KEGG : https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?dr_ja:D07723

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料を固相カートリッジに通水し、精製水で洗浄した後、十分に乾燥してメタノールで溶出する。溶出液に精製水を加えて定容し、LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive / Negative)で測定する。なお、本法でフェノフィブラート、クリノフィブラート及びベザフィブラートの同時分析が可能である。

(2) 試薬・器具

【試薬】

クロフィブラート	: Toronto Research Chemicals 製
クロフィブリン酸	: 富士フイルム和光純薬製
クロフィブラート- <i>d</i> ₄	: Toronto Research Chemicals 製
クロフィブリン酸- <i>d</i> ₄	: Toronto Research Chemicals 製

ヘキサン、アセトン	: 富士フイルム和光純薬製 残留農薬・PCB 分析用
メタノール	: 関東化学製 LC/MS 用
ギ酸	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
1 mol/L ギ酸アンモニウム水溶液	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
精製水（注 1）	: 超純水（MERCK MILLIPORE 製）
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis HLB

【標準液の調製】

〔標準液〕

クロフィブラート及びクロフィブリン酸を正確に 10.0 mg 量り取り、メタノール 100 mL に溶解して 100 µg/mL のクロフィブラート及びクロフィブリン酸標準原液を調製する。この標準原液をメタノールで適宜希釈して 1000 ng/mL のクロフィブラート及びクロフィブリン酸の混合標準液を調製する。

〔サロゲート内標準液〕

クロフィブラート- d_4 及びクロフィブリン酸- d_4 を正確に 10.0 mg 量り取り、メタノール 100 mL に溶解して 100 µg/mL のサロゲート内標準原液をそれぞれ調製する。サロゲート内標準原液をメタノールで適宜希釈して 1000 ng/mL のクロフィブラート- d_4 及びクロフィブリン酸- d_4 のサロゲート内標準液をそれぞれ調製する。

〔検量線用標準液〕

1000 ng/mL 混合標準液を 2.5~500 µL 分取し、メタノール/精製水(1:1)の溶液を用いて 5.0 mL に希釈して 0.50~100 ng/mL の検量線用標準液を調製する。また、各濃度の検量線用標準液にはクロフィブラート- d_4 が 20 ng/mL 及びクロフィブリン酸- d_4 が 100 ng/mL になるようにサロゲート内標準液を添加する。

【器具】

ビーカー、メスフラスコ、目盛付き試験管、コンセンレーター、窒素吹き付け装置、マイクロピペット（注 2）、パスツールピペット等
JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従う。

水質試料はガラス製の容器に採取し、採取後 1 週間以内を目安に速やかに分析を行う。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 100 mL にサロゲート内標準液（1000 ng/mL クロフィブラート-*d*₄ を 200 µL 及び 1000 ng/mL クロフィブリン酸-*d*₄ を 1000 µL）を添加し、十分に混和した後、あらかじめメタノール 10 mL 及び精製水 10 mL で順次コンディショニングした固相カートリッジに 10 mL/min で通水する。通水後、固相カートリッジを精製水 10 mL で洗浄し、20 分程度窒素ガスを通気して乾燥し、固相カートリッジ中の水分を除去する。脱水後、メタノール 5 mL で溶出し、精製水を添加して 10 mL に定容したものを試験液とする。

【空試験液の調製】

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

【測定】

〔LC/MS 条件〕

〔LC 条件〕

機種	: Waters 製 Acquity H-class
カラム	: Waters 製 CORTECS C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 µm)
移動相	: A: 0.1vol%ギ酸含有 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B: メタノール 0→0.5 min A : B = 55 : 45 0.5→7 min A : 55 → 10 , B : 45 → 90 linear gradient 7→9 min A : B = 0 : 100 9→12 min A : B = 55 : 45
カラム流量	: 0.30 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 1 µL

〔MS 条件〕

機種	: Waters 製 Xevo TQD
キャピラリー電圧	: 3.00 kV (positive), 2.50 kV (negative)
コーンガス流量	: 50 L/hr
デソルベーションガス流量	: N ₂ (650 L/hr)
ソース温度	: 150°C

デソルベーション温度 : 200°C
 イオン化法 : ESI-Positive (クロフィブラート)
 : ESI- Negative (クロフィブリン酸)
 測定モード : SRM

物質名	コーン電圧 (V)	コリジョン 電圧(V)	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z) (注 3)
クロフィブラート	26	14	243.1>87.0	243.1>115.0
クロフィブラート-d ₄	28	14	264.0>86.9	246.9>86.9 264.0>173.3
クロフィブリン酸	24	18	213.0>126.9	213.0>85.0
クロフィブリン酸-d ₄	24	20	216.9>131.0	216.9>85.0

〔検量線〕

検量線用標準液 1 μL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 1 μL を LC/MS/MS に注入して、対象物質とサロゲート内標準のピーク面積比から検量線を基にして試験液中の対象物質濃度を求める。

〔濃度の算出〕

試料中の濃度 C (ng/L) は、次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準に対する対象物質の濃度比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (ng)

(添加するサロゲート内標準液の濃度 (ng/mL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (μL)/1000)

V : 試料量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$Q = 200$ (ng) (クロフィブラート)

$Q = 1000$ (ng) (クロフィブリン酸)

$V = 0.10$ (L)

即ち、

$$C = R \times 2000 \text{ (ng/L)} \quad (\text{クロフィブラート})$$

$$C = R \times 10000 \text{ (ng/L)} \quad (\text{クロフィブリン酸})$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す (注 4)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
クロフィブラート	0.20	0.10	10	0.020
クロフィブリン酸	0.39	0.10	10	0.039

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 5)。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
クロフィブラート	海水	0.10	10	0.028	0.074
	河川水	0.10	10.	0.015	0.040
クロフィブリン酸	海水	0.10	10	0.033	0.088
	河川水	0.10	10	0.022	0.059

注 解

- (注 1) MilliQ 水の採水口に EDS-PAK (活性炭カートリッジ) を取り付けて採取した精製水を使用した。
- (注 2) マイクロピペットは精度管理もしくはバリデーションされたものを用いること。
- (注 3) クロフィブラート及びクロフィブリン酸の確認イオンの強度は弱く、低濃度の場合はピークの確認ができないことがある。
- (注 4) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に準じて、表 3 のとおり算出した。また測定時の代表的なクロマトグラムを図 1 に示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	クロフィブラート	クロフィブリン酸
試料量 (mL)	100	100
最終液量 (mL)	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	1.0
注入量 (pg)	0.50	1.0
装置注入量 (μL)	1	1
結果 1 (pg)	0.441	1.12
結果 2 (pg)	0.419	1.36
結果 3 (pg)	0.426	1.09
結果 4 (pg)	0.521	1.24
結果 5 (pg)	0.530	1.26
結果 6 (pg)	0.538	1.11
結果 7 (pg)	0.420	1.08
結果 8 (pg)	0.433	1.11
平均値 (pg)	0.4660	1.172
標準偏差 (σ_{n-1})(pg)	0.0534	0.102
IDL (pg)	0.20	0.39
IDL 試料換算 (μg/L)	0.020	0.039
S/N 比	12	9
CV (%)	11	8.7

* : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

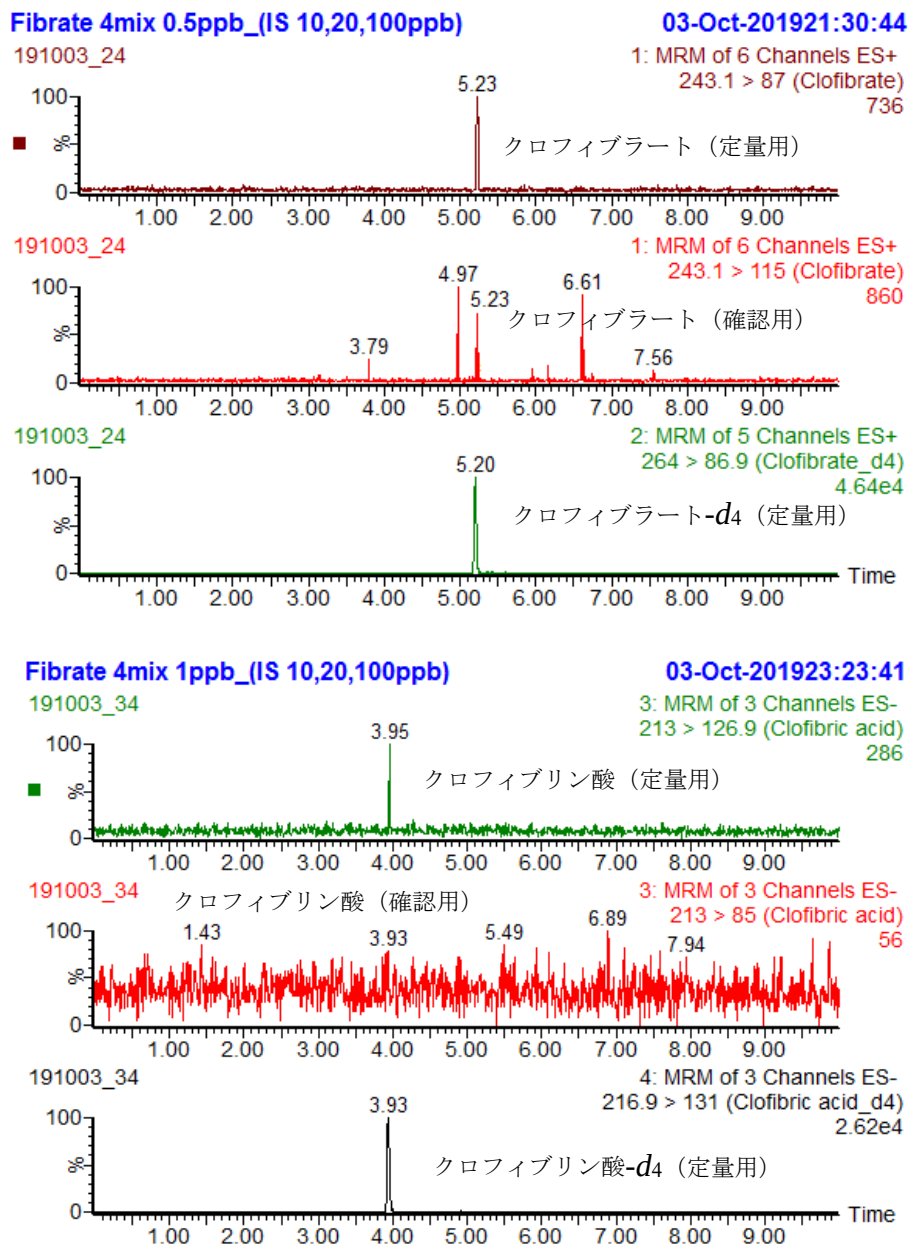


図1 IDL 測定時の SRM クロマトグラム

(注 5) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に準じて、以下の表 4-1~4-2 のとおり算出した。また測定時の代表的なクロマトグラムを図 2-1~3-2 に示す。なお、河川水・天白橋については無添加試料からも検出されたため、無添加試料の繰り返し測定から MDL を算出した。

表 4-1 MDL 及び MQL の算出結果 (海水) (詳細) *1

物質名	クロフィブ補正後回 サロゲート			クロフィブ補正後回 サロゲート		
	ラート	収率(%)	回収率(%)	リン酸	収率(%)	回収率(%)
試料	海水	-	-	海水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-	-
標準添加量 (ng)	10	-	-	10	-	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.10	-	-	0.10	-	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-	-
注入濃度 (ng/mL)	1.0	-	-	1.0	-	-
装置注入量 (µL)	1	-	-	1	-	-
操作ブランク平均 (µg/L)*2	<0.028	-	99	<0.033	-	99
無添加平均 (µg/L)*3	<0.028	-	97	<0.033	-	98
結果 1 (µg/L)	0.107	107	89	0.119	119	104
結果 2 (µg/L)	0.110	110	89	0.108	108	112
結果 3 (µg/L)	0.0922	92	92	0.0907	91	107
結果 4 (µg/L)	0.0984	98	91	0.101	101	106
結果 5 (µg/L)	0.103	103	92	0.113	113	111
結果 6 (µg/L)	0.105	105	91	0.110	110	102
結果 7 (µg/L)	0.113	113	92	0.100	100	97
結果 8 (µg/L)	0.0943	94	94	0.105	105	98
平均値 (µg/L)	0.1028	103	91.2	0.1057	106	104.6
標準偏差 (σ_{n-1})(µg/L)	0.00735			0.00884		
MDL (µg/L)*4	0.028			0.033		
MQL (µg/L)*5	0.074			0.088		
S/N	48			19		
CV (%)	7.2			8.4		

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 空試験液を測定した値の平均値 (n = 3)

*3 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 5)

*4 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

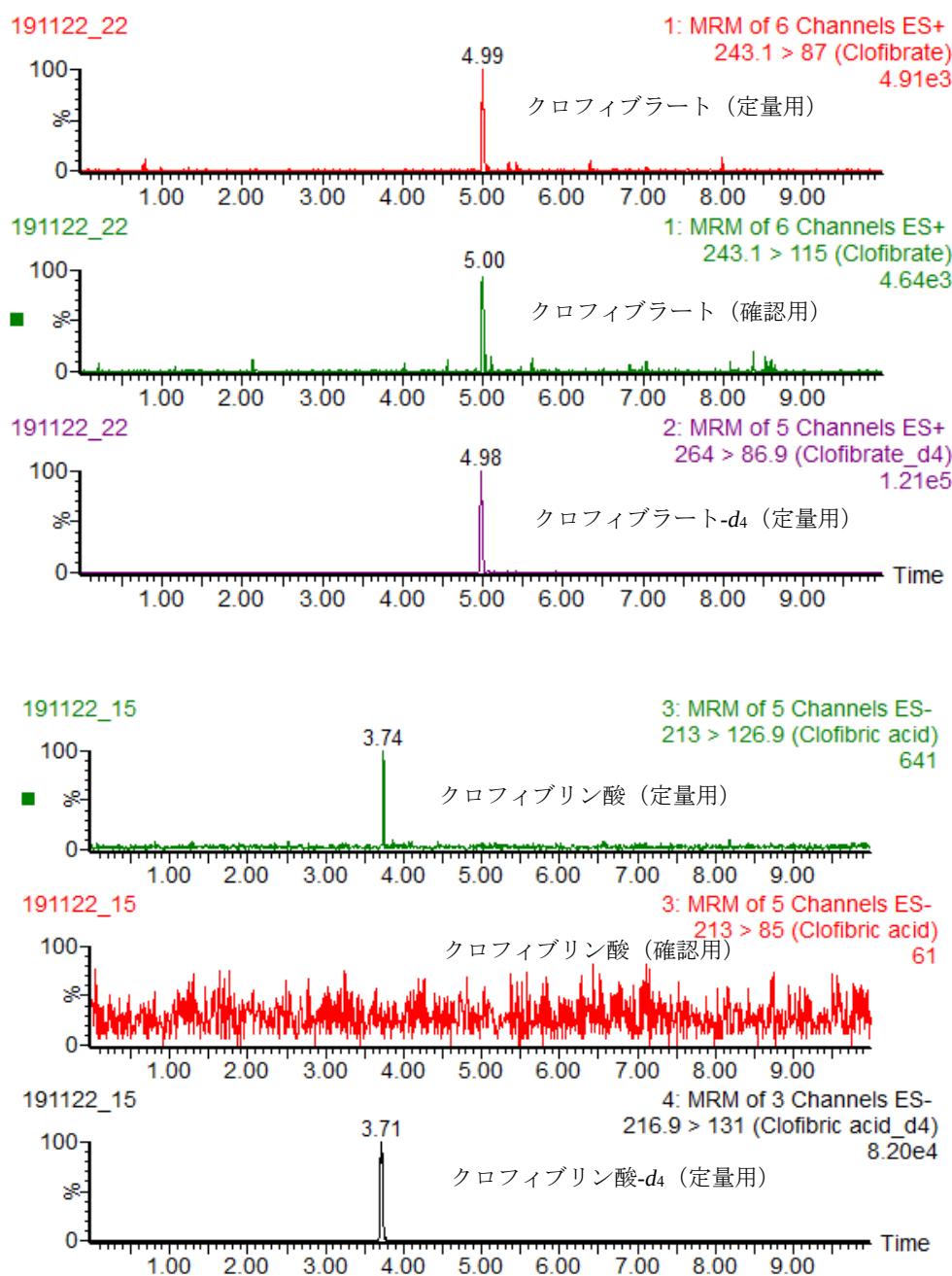


図 2-1 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、添加試料)

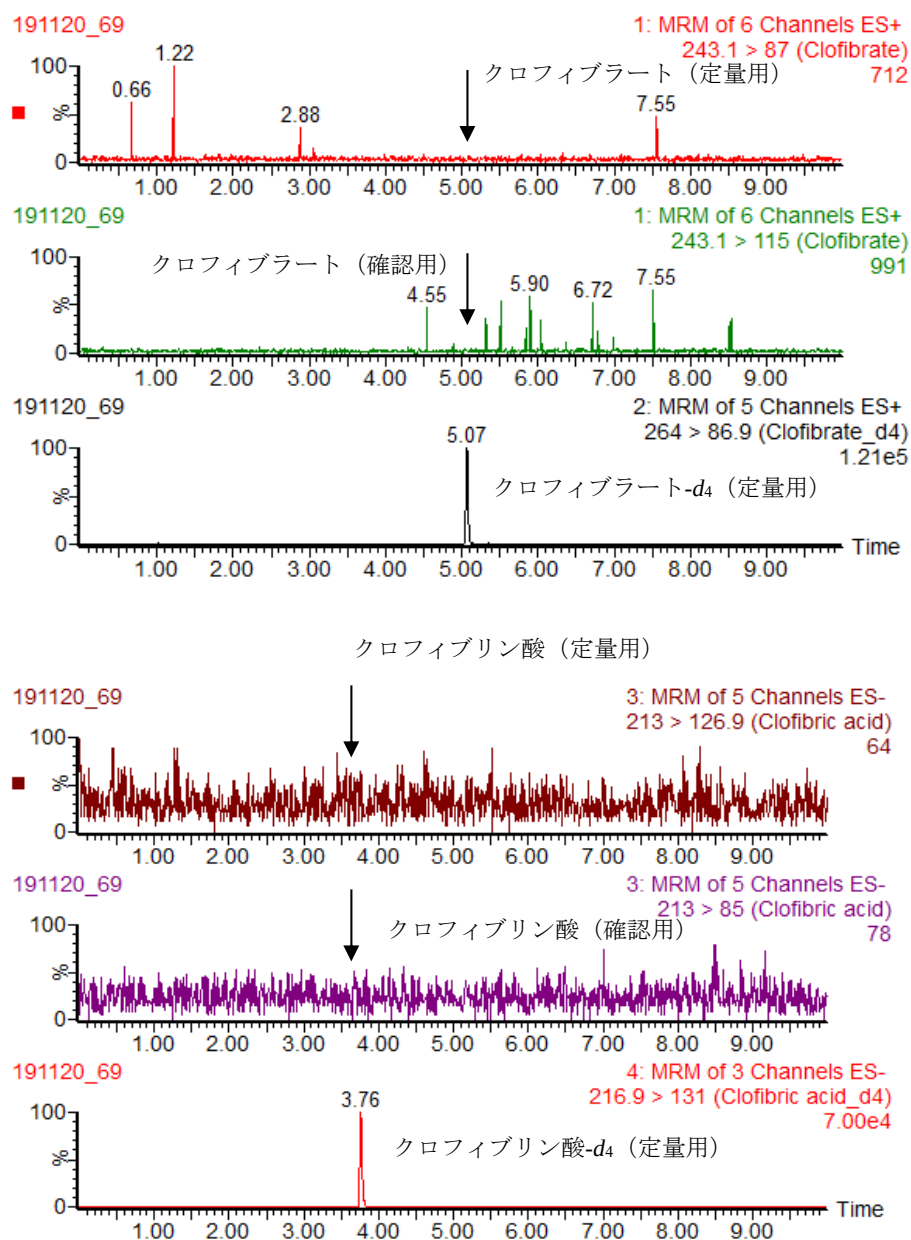


図 2-2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、無添加試料)

表 4-2 MDL 及び MQL の算出結果 (河川水) (詳細) *1

物質名	クロフィブ補正後回 サロゲート			クロフィブ補正後回 サロゲート		
	ラート	収率(%)	回収率(%)	リン酸	収率(%)	回収率(%)
試料	河川水	-	-	河川水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-	-
標準添加量 (ng)	10	-	-	10	-	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.10	-	-	0.10	-	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-	-
注入濃度 (ng/mL)	1.0	-	-	1.0	-	-
装置注入量 (µL)	1	-	-	1	-	-
操作ブランク平均 (µg/L) *2	<0.015	-	99	<0.022	-	99
無添加平均 (µg/L) *3	<0.015	-	87	<0.022	-	95
結果 1 (µg/L)	0.100	100	88	0.108	108	98
結果 2 (µg/L)	0.0973	97	86	0.116	116	95
結果 3 (µg/L)	0.103	103	85	0.118	118	99
結果 4 (µg/L)	0.0919	92	88	0.109	109	97
結果 5 (µg/L)	0.105	105	89	0.109	109	99
結果 6 (µg/L)	0.102	102	90	0.112	112	95
結果 7 (µg/L)	0.0991	99	91	0.112	112	100
結果 8 (µg/L)	0.0974	97	92	0.098	98	99
平均値 (µg/L)	0.0994	99	88.7	0.1102	110	97.9
標準偏差 (σ _{n-1})(µg/L)	0.00402			0.00588		
MDL (µg/L) *4	0.015			0.022		
MQL (µg/L) *5	0.040			0.059		
S/N	35			13		
CV (%)	4.0			5.3		

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 空試験液を測定した値の平均値 (n = 3)

*3 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 5)

*4 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

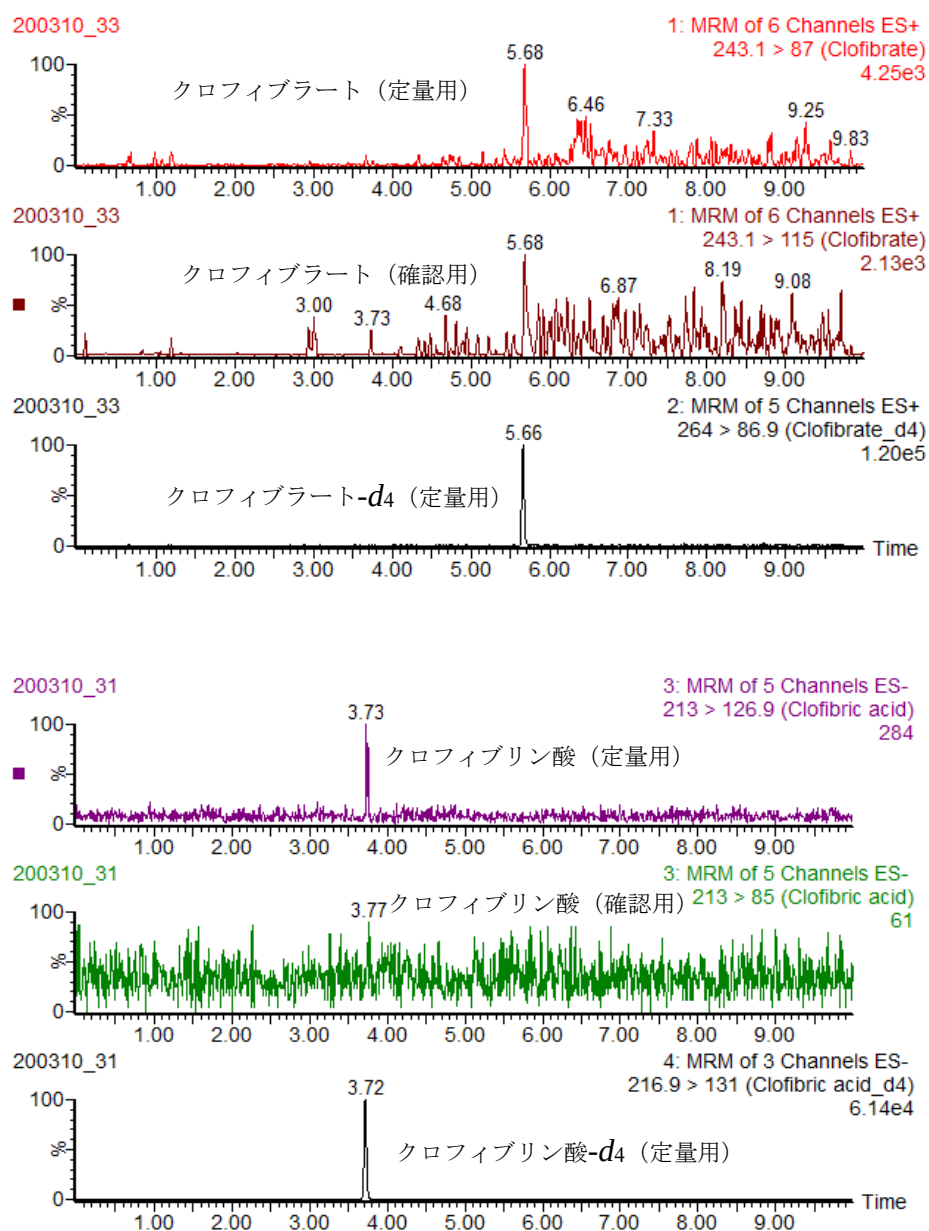


図 3-1 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(河川水、添加試料)

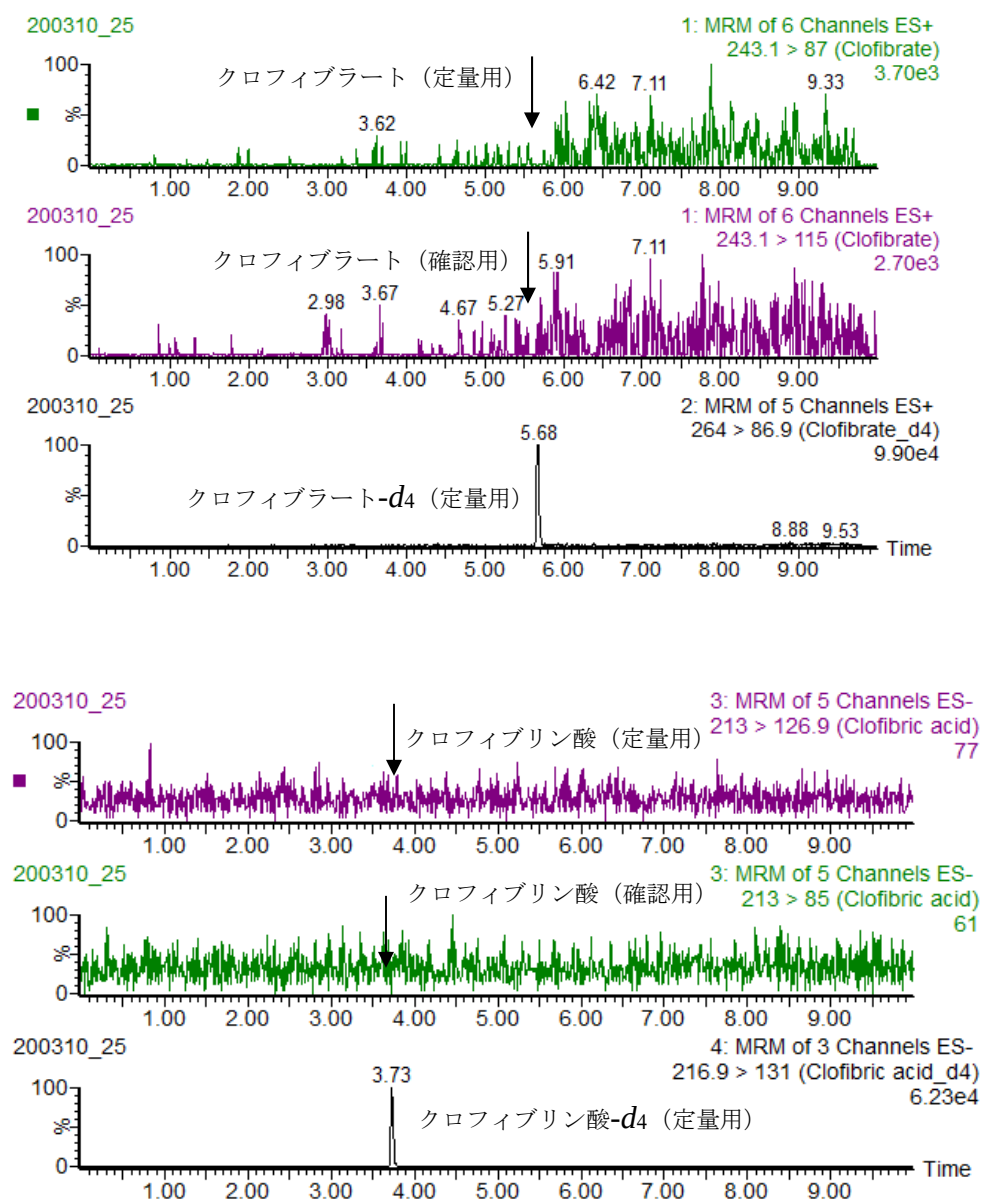


図 3-2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(河川水、無添加試料)

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図4に示す。

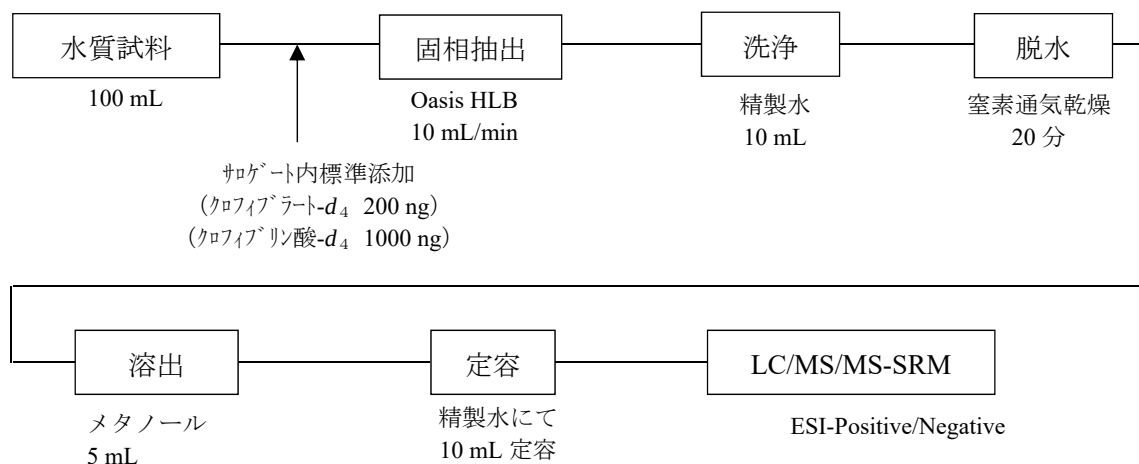


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

クロフィブラート及びクロフィブリン酸の検量線を図5、6に、検量線データを表5、6に示す。

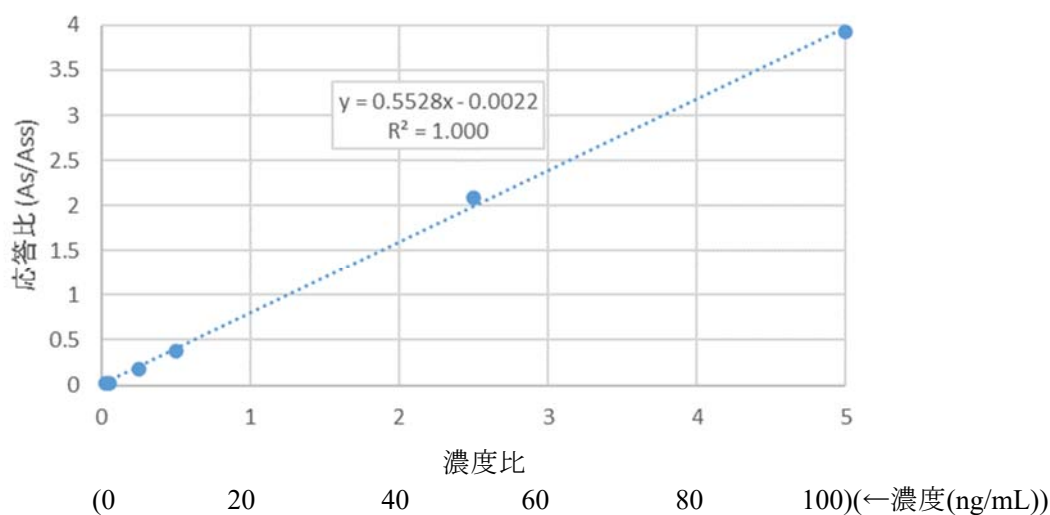


図5-1 クロフィブラートの検量線（高濃度域 0.50~100 ng/mL）

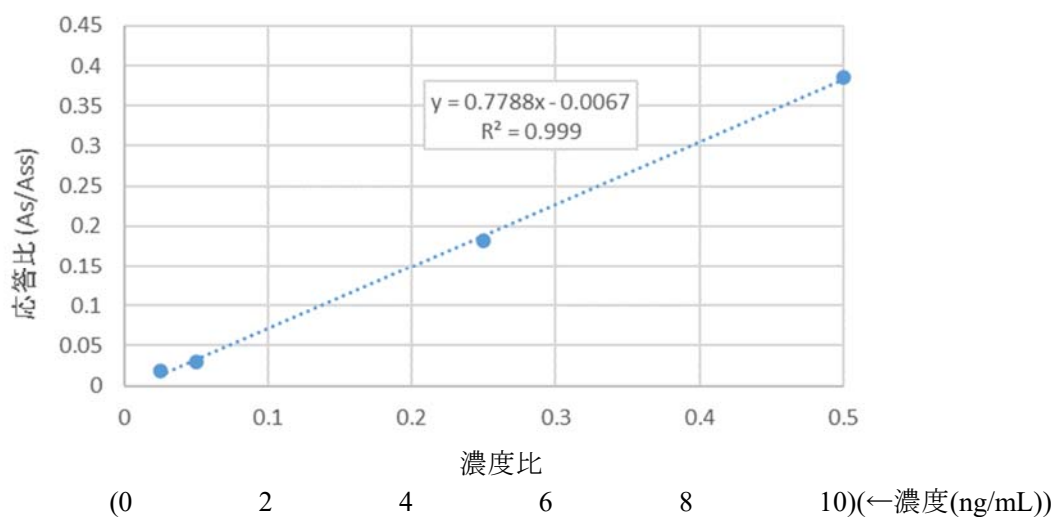


図 5-2 クロフィブラートの検量線（低濃度域 0.50~10 ng/mL）

表 5 クロフィブラート検量線作成時のデータ

標準液濃度 (ng/mL)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		応答比 (As/Ass)
		調査物質(As) クロフィブラート (m/z 243.1>87.0)	サロゲート内標準 (Ass) クロフィブラート- d_4 (m/z 264.0>86.9)	
0.50	0.025	77	4190	0.0184
1.0	0.050	117	3927	0.0298
5.0	0.25	785	4319	0.1817
10	0.50	1695	4394	0.3858
50	2.5	8981	4290	2.0936
100	5.0	16064	4091	3.9270

Cis*:サロゲート内標準濃度：20 ng/mL

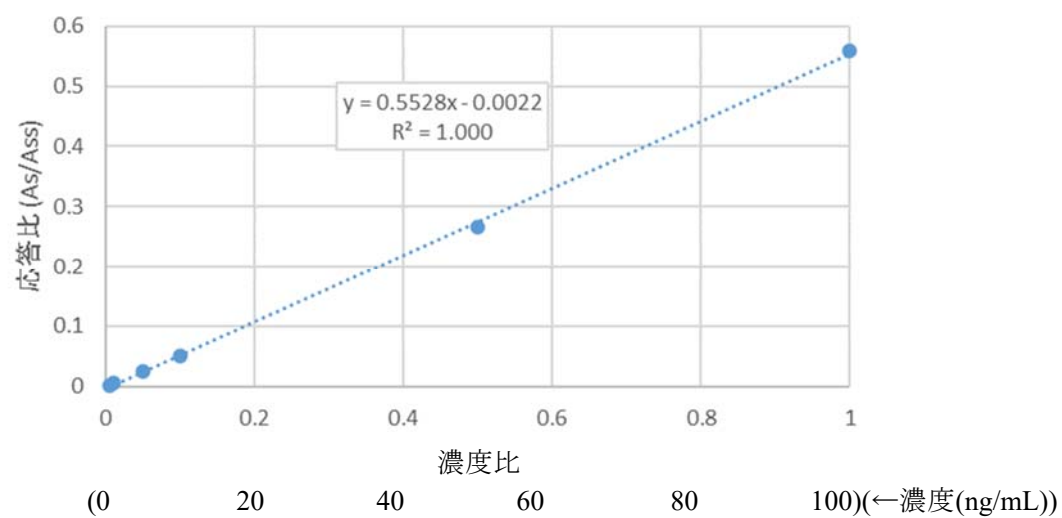


図 6-1 クロフィブリン酸の検量線（高濃度域 0.50~100 ng/mL）

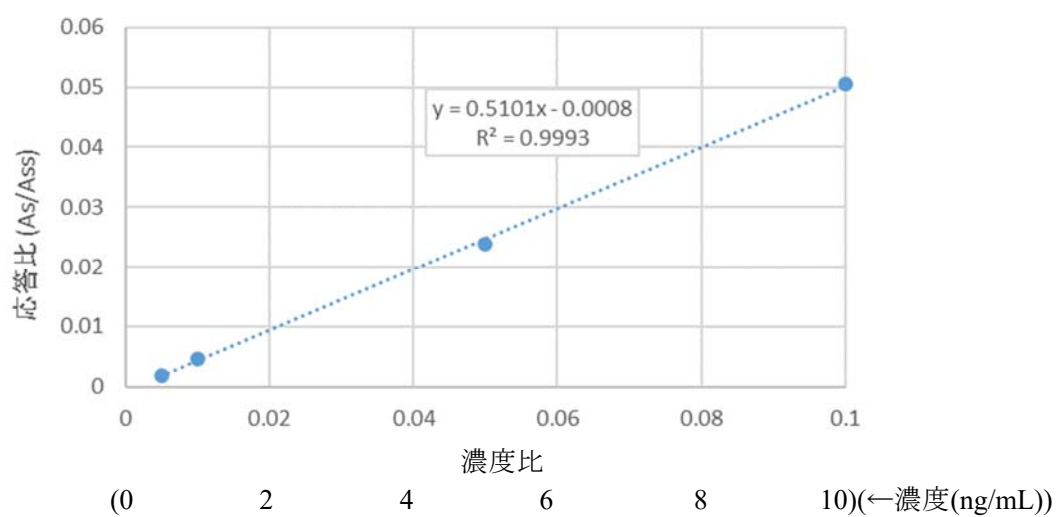


図 6-2 クロフィブリン酸の検量線（低濃度域 0.50~10 ng/mL）

表 6 クロフィブリン酸検量線作成時のデータ

標準試料濃度 (ng/mL)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		応答比 (As/Ass)
		調査物質(As) クロフィブリン酸 (m/z 213.0>126.9)	サロゲート内標準 (Ass) クロフィブリン酸- d_4 (m/z 216.9>131.0)	
0.50	0.005	5	2621	0.0019
1.0	0.010	11	2426	0.0045
5.0	0.050	58	2440	0.0238
10	0.10	125	2472	0.0506
50	0.50	633	2384	0.2656
100	1.0	1176	2107	0.5582

Cis*:サロゲート内標準濃度：100 ng/mL

[クロマトグラム]

標準液のクロマトグラムを図7に示す。

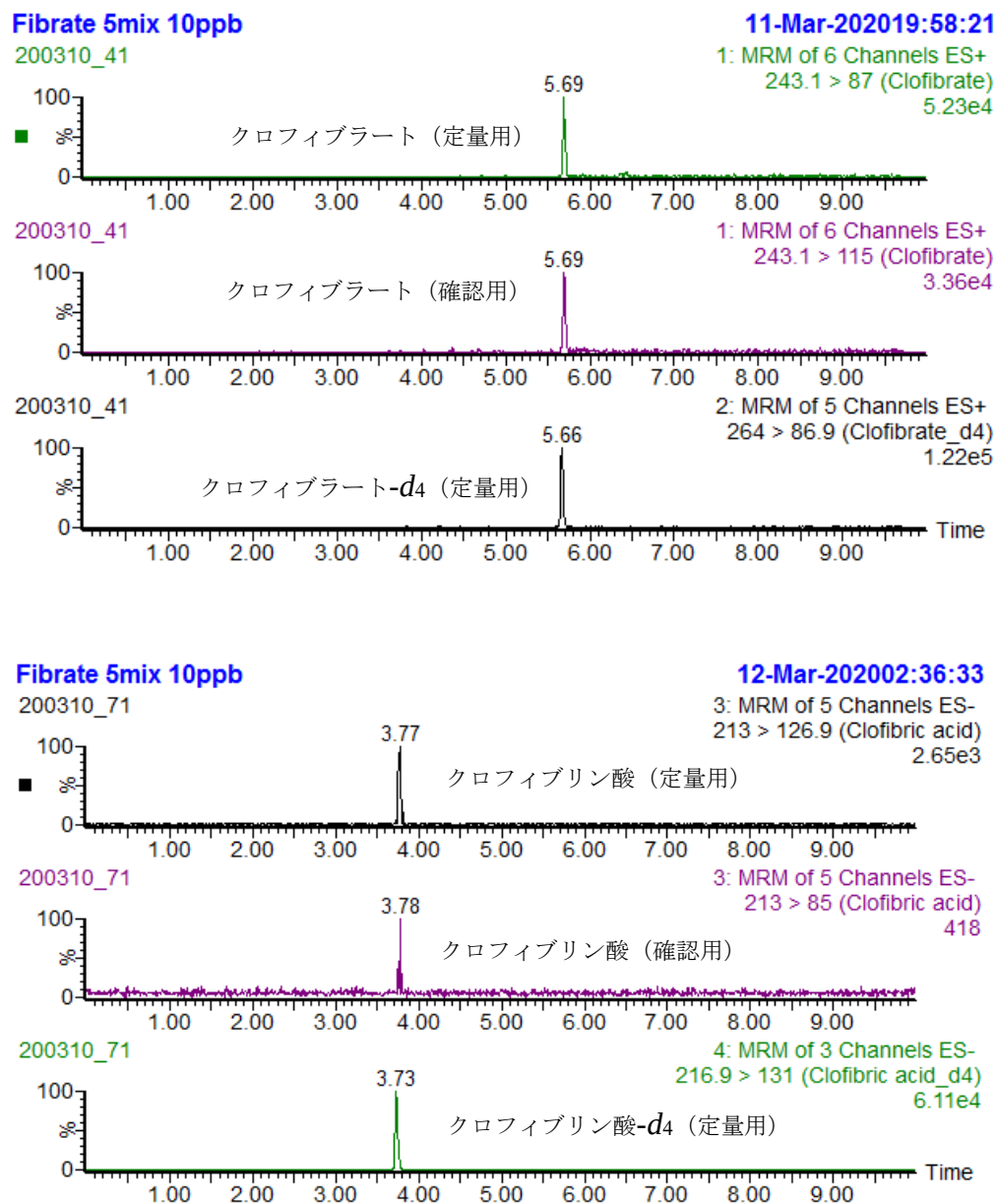


図7 標準液(10 ng/mL)のクロマトグラム

[マススペクトル]

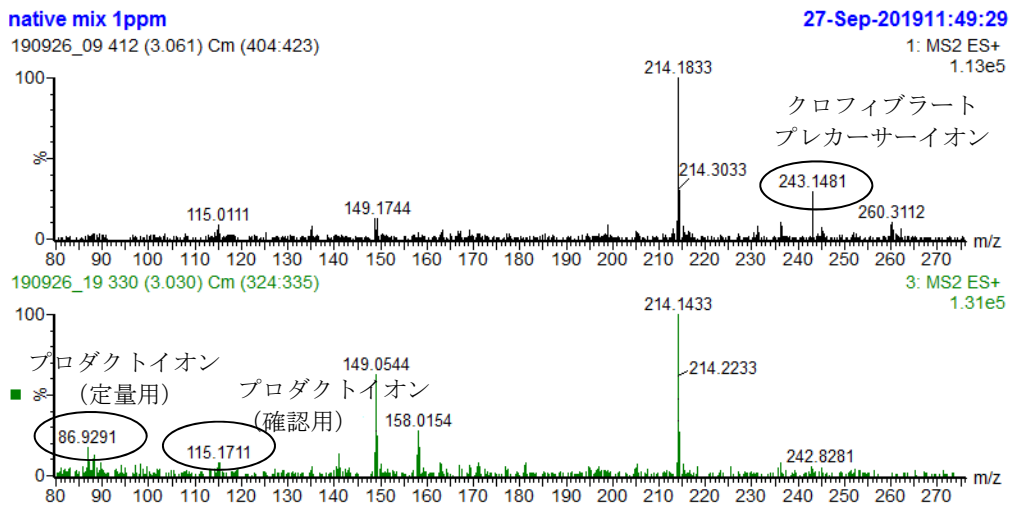


図 8-1 クロフィブラートのマススペクトル
(上段がプレカーサーイオンスキャン、下段がプロダクトイオンスキャン)

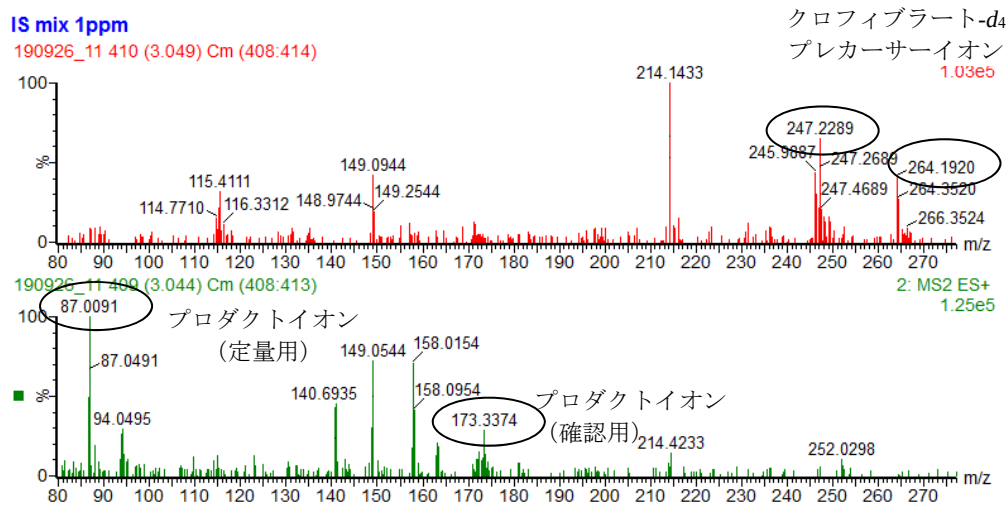


図 8-2 クロフィブラート- d_4 のマススペクトル
(上段がプレカーサーイオンスキャン、下段がプロダクトイオンスキャン)

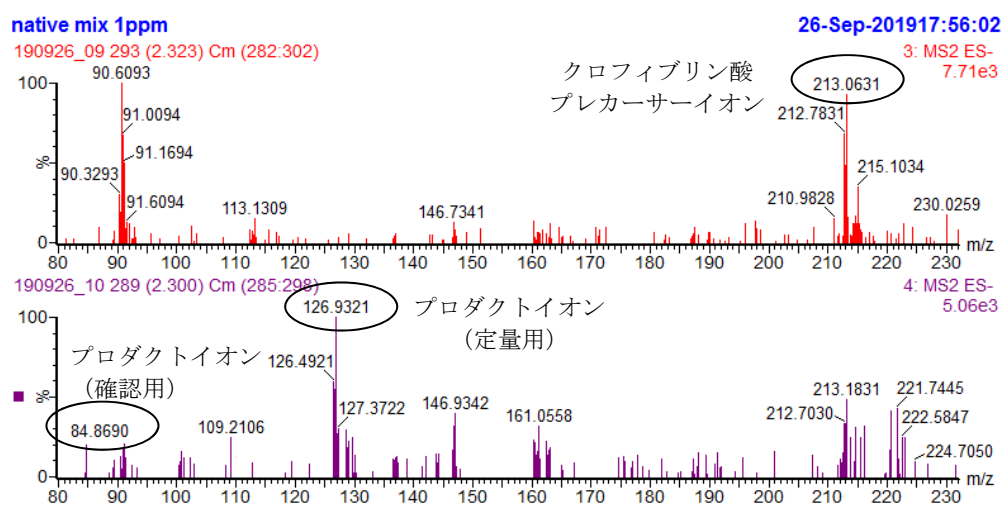


図 8-3 クロフィブリン酸のマススペクトル
(上段がプレカーサーイオンスキャン、下段がプロダクトイオンスキャン)

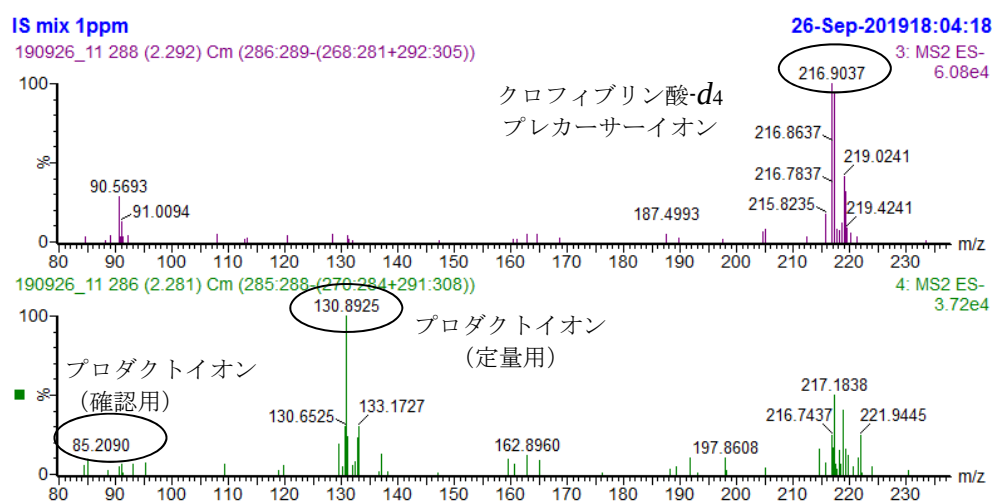


図 8-4 クロフィブリン酸- d_4 のマススペクトル
(上段がプレカーサーイオンスキャン、下段がプロダクトイオンスキャン)

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験のクロマトグラムを図9に示す。対象物質のピークは確認されなかった。

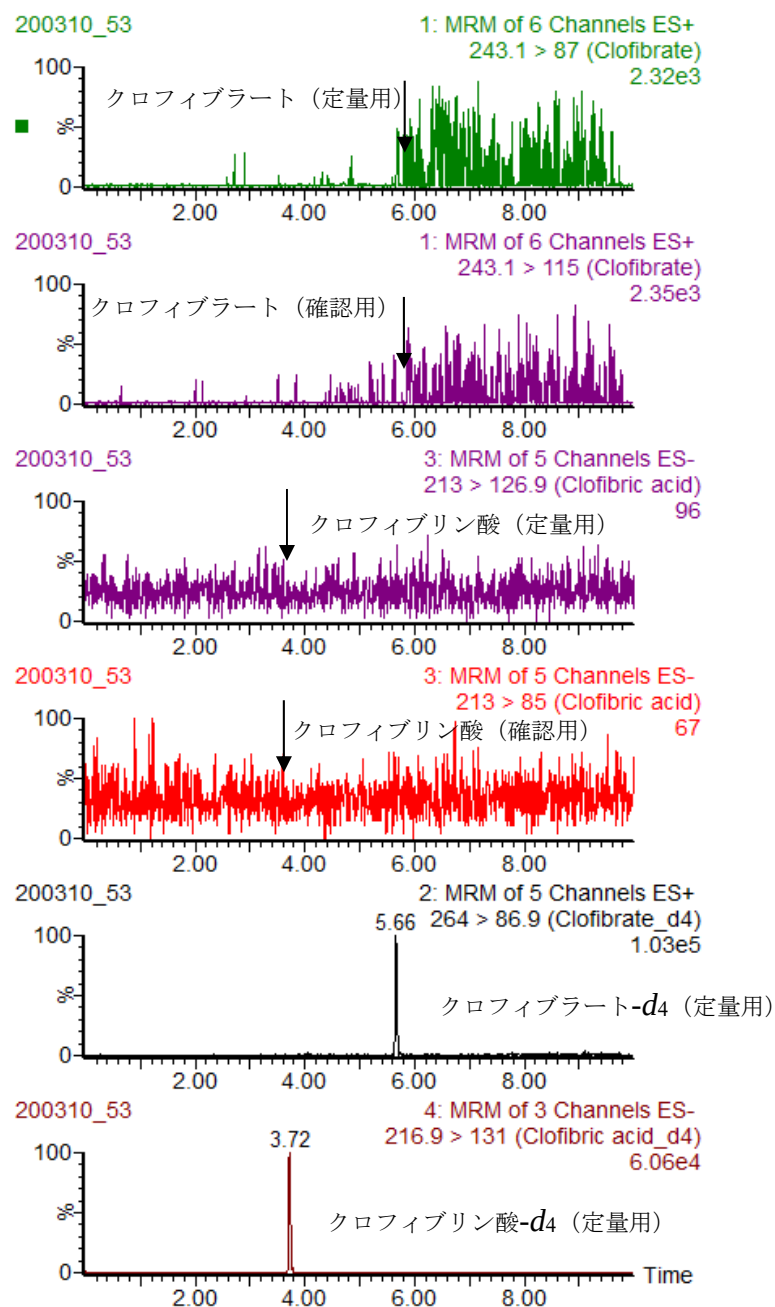


図9 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

海水及び河川水を用いた添加回収試験結果を表 7 に示す。クロマトグラムは図 2-1～3-2 を参照。

表 7 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験 数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート 回収率(%)
クロフィブ	海水	0.10	0	5	<0.028	-	1.9	97
	(港新橋)	0.10	10	8	0.10	103	2.1	91
ラート	河川水	0.10	0	5	<0.015	-	3.1	87
	(大森橋)	0.10	10	8	0.099	99	4.0	89

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験 数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート 回収率(%)
クロフィブ	海水	0.10	0	5	<0.033	-	3.7	98
	(港新橋)	0.10	10	8	0.11	106	8.4	105
リン酸	河川水	0.10	0	5	<0.022	-	4.1	95
	(大森橋)	0.10	10	8	0.11	110	5.3	98

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 8 に示す。

表 8-1 クロフィブラートの分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)			
			1 時間後	1 日後	4 日後	7 日後
5	2	5	5.2(105)	5.4(108)	4.8(97)	5.0(100)
7 (明所)	2	5	5.1(101)	4.9(99)	5.1(101)	5.1(101)
7 (暗所)	2	5	5.3(105)	5.1(103)	4.9(99)	4.9(99)
9	2	5	5.2(104)	5.3(107)	5.0(100)	5.1(102)

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表 8-2 クロフィブリン酸の分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)			
			1 時間後	1 日後	4 日後	7 日後
5	2	5	5.2(104)	5.2(104)	5.2(104)	4.8(96)
7 (明所)	2	5	5.3(106)	5.1(102)	5.3(106)	4.6(91)
7 (暗所)	2	5	5.0(101)	5.2(104)	5.3(106)	4.6(91)
9	2	5	5.3(107)	5.2(105)	5.3(106)	4.1(82)

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 9 に示す。

サンプリングから 1 週間以内であれば、対象物質の保存性に問題はないと思われるが、サンプリング後はできるだけ早く分析をするのが望ましい。

表 9-1 クロフィブラートの保存性試験結果

試料	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)				
			1 日後	4 日後	7 日後	14 日後	1 ヶ月後
河川水試料	2	5	5.3(106)	4.7(96)	4.2(84)		
河川水粗抽出液	2	1	-	-	-	1.0(100)	
海水試料	2	5	5.2(105)	5.0(101)	4.8(97)		
海水粗抽出液	2	5	-	-	-	5.1(101)	
標準液	2	1	-	-	-		0.99(99)

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表 9-2 クロフィブリン酸の保存性試験結果

試料	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)				
			1 日後	4 日後	7 日後	14 日後	1 ヶ月後
河川水試料	2	5	5.0(100)	4.9(98)	4.9(99)		
河川水粗抽出液	2	1	-	-	-	1.1(105)	
海水試料	2	5	5.0(100)	5.0(101)	4.9(99)		
海水粗抽出液	2	5	-	-	-	5.1(102)	
標準液	2	1	-	-	-		1.1(107)

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔固相抽出の検討〕

精製水、河川水、海水 100mL にそれぞれ、フィブラート系化合物各 100 ng と内標準物質を添加し、予めメタノール 10 mL 及び精製水 10 mL でコンディショニングを行った固相（Oasis HLB）へ通液した。固相は窒素通気により乾燥後、5 mL のメタノールにて溶出し、精製水を加えて 10 mL に定容した。

試料にギ酸を添加した場合としなかった場合の結果を表 10 に示す。

ギ酸の添加、無添加ともに大差はなかったが、5 種類のフィブラート系物質を同時分析する際には、ギ酸を添加せずに前処理を行った方がよいと考え、今回の分析法ではギ酸は添加しないこととした。

表 10-1 各試料へのギ酸添加の効果について（ギ酸無添加）

試料	精製水		河川水		海水	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2
クロフィブラート	100	99	100	94	97	98
クロフィブリン酸	97	89	98	90	85	83
フェノフィブラート	74	67	68	68	76	74
クリノフィブラート	98	92	89	87	97	96
ベザフィブラート	99	98	100	98	100	98

表 10-2 各試料へのギ酸添加の効果について（ギ酸添加）

0.1%ギ酸添加 試料	精製水		河川水		海水	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2
クロフィブラート	104	106	100	97	95	98
クロフィブリン酸	97	96	99	91	99	96
フェノフィブラート	61	71	62	66	72	74
クリノフィブラート	59	61	76	74	64	62
ベザフィブラート	100	98	100	97	99	98

〔環境試料の分析〕

本法を用いて名古屋市内の河川水及び海水を測定した結果、クロフィブラート及びクロフィブリン酸が MDL 以上の濃度で検出されなかった。クロマトグラムを図 2-2、3-2 に示す。ただし、後述の〔高濃縮条件での測定の検討〕に示したように濃縮倍率を高くすることで検出される場合がある。

〔同時分析可能な物質〕

現在日本国内で使用されているフィブラート系の高脂血症治療薬は、今回の分析法開発対象物質となっているクロフィブラート以外に、フェノフィブラート、クリノフィブラート、ベザフィブラートがある。それらについて同時分析可能か検討を行った。

〔同時分析物質の MS 条件〕

フェノフィブラート、ベザフィブラート、ベザフィブラート- d_6 はポジティブイオンモードで、クリノフィブラートはネガティブイオンモードで測定した。また、フェノフィブラート及びクリノフィブラートは d 体の販売がないため、保持時間が比較的近いクロフィブラート- d_6 を用いて補正することとした。

物質名	コーン電 圧(V)	コリジョン電 圧(V)	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)
フェノフィブラート	38	18	361.1>233.1	361.1>138.9
クリノフィブラート	48	34	467.2>267.1	467.2>367.1
ベザフィブラート	32	13	362.2>316.1	362.2>138.9
ベザフィブラート- d_6	38	32	368.0>139.0	368.0>322.1

〔同時分析物質の IDL〕

表 11 同時分析物質の IDL の算出結果

対象物質名	フェノフィブラート	クリノフィブラート	ベザフィブラート
試料量 (mL)	100	100	100
最終液量 (mL)	10.0	10.0	10.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.10	0.10	0.10
注入量 (pg)	0.10	0.10	0.10
装置注入量 (μL)	1	1	1
結果 1 (pg)	0.111	0.106	0.107
結果 2 (pg)	0.0901	0.0861	0.104
結果 3 (pg)	0.120	0.0973	0.0972
結果 4 (pg)	0.0895	0.0892	0.101
結果 5 (pg)	0.0908	0.0923	0.104
結果 6 (pg)	0.0922	0.0918	0.0907
結果 7 (pg)	0.107	0.0952	0.0984
結果 8 (pg)	0.0943	0.0820	0.0930
平均値 (pg)	0.09936	0.09243	0.09930
標準偏差 (pg)	0.0117	0.00719	0.00561
IDL (σ_{n-1}) (pg)	0.044	0.027	0.021
IDL 試料換算 (mg/L)	0.0044	0.0027	0.0021
S/N 比	9	13	15
CV (%)	12	7.8	5.6

* : IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

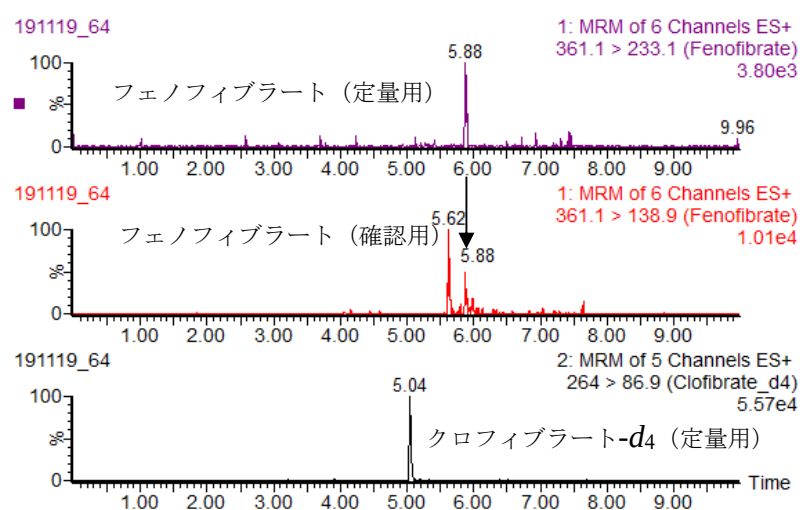


図 10-1 IDL 測定時の SRM クロマトグラム (フェノフィブラート)

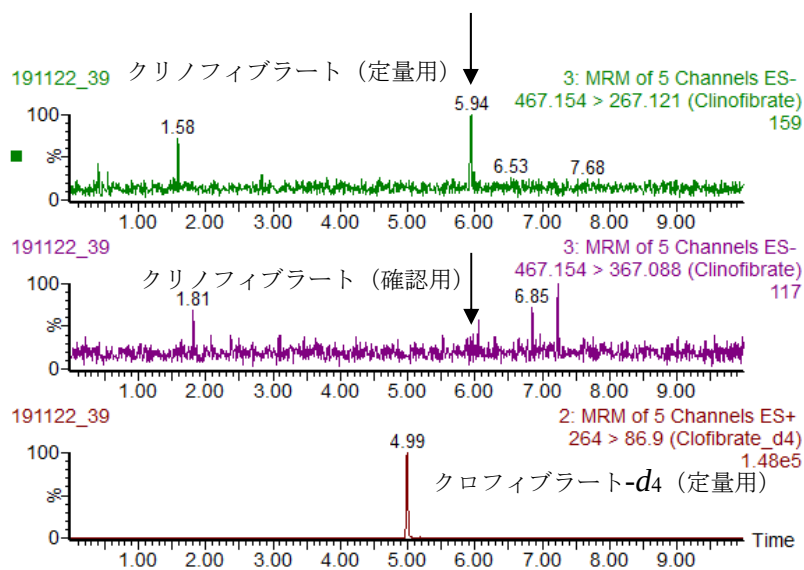


図 10-2 IDL 測定時の SRM クロマトグラム (クリノフィブラート)

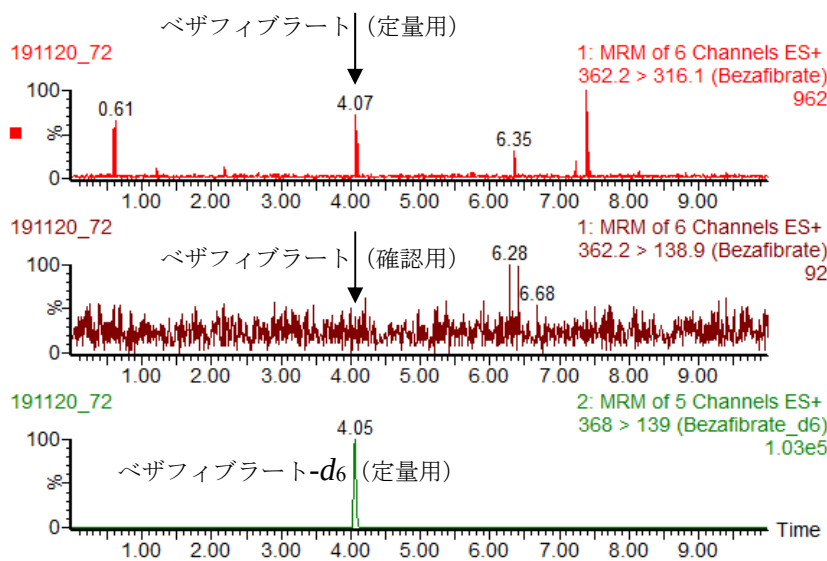


図 10-3 IDL 測定時の SRM クロマトグラム (ベザフィブラート)

〔同時分析物質の MDL 及び MQL〕

表 12 同時分析物質の MDL の算出結果*1

物質名	フェノフィブ レート	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)	クリノフィブ レート	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)	ヘキサフィブ レート	補正後 回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)
試料	海水	-	-	海水	-	-	海水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-	-	0.10	-	-
標準添加量 (ng)	10	-	-	10	-	-	10	-	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.10	-	-	0.10	-	-	0.10	-	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-	-	10	-	-
注入濃度 (ng/mL)	1.0	-	-	1.0	-	-	1.0	-	-
装置注入量 (μL)	1	-	-	1	-	-	1	-	-
操作ブランク平均 (μg/L) *2	<0.023	-	99	<0.021	-	99	<0.054	-	99
無添加平均 (μg/L) *3	<0.023	-	97	<0.021	-	97	0.0558	-	94
結果 1 (μg/L)	0.0785	79	89	0.101	101	89	0.155	99	104
結果 2 (μg/L)	0.0664	66	89	0.106	106	89	0.156	100	112
結果 3 (μg/L)	0.0742	74	92	0.106	106	92	0.153	97	107
結果 4 (μg/L)	0.0663	66	91	0.114	114	91	0.152	96	106
結果 5 (μg/L)	0.0679	68	92	0.096	96	92	0.155	99	111
結果 6 (μg/L)	0.0721	72	91	0.107	107	91	0.156	100	102
結果 7 (μg/L)	0.0832	83	92	0.101	101	92	0.153	97	97
結果 8 (μg/L)	0.0753	75	94	0.101	101	94	0.155	99	98
平均値 (μg/L)	0.07298	73	91.2	0.1040	104	91.2	0.1543	99	104.6
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00605			0.00545			0.00143		
MDL (μg/L) *4	0.023			0.021			0.0054		
MQL (μg/L) *5	0.061			0.055			0.014		
S/N	48			48			48		
CV (%)	8.3			5.2			0.9		

*1：定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2：空試験液を測定した値の平均値 (n = 3)

*3：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 5)

*4：MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

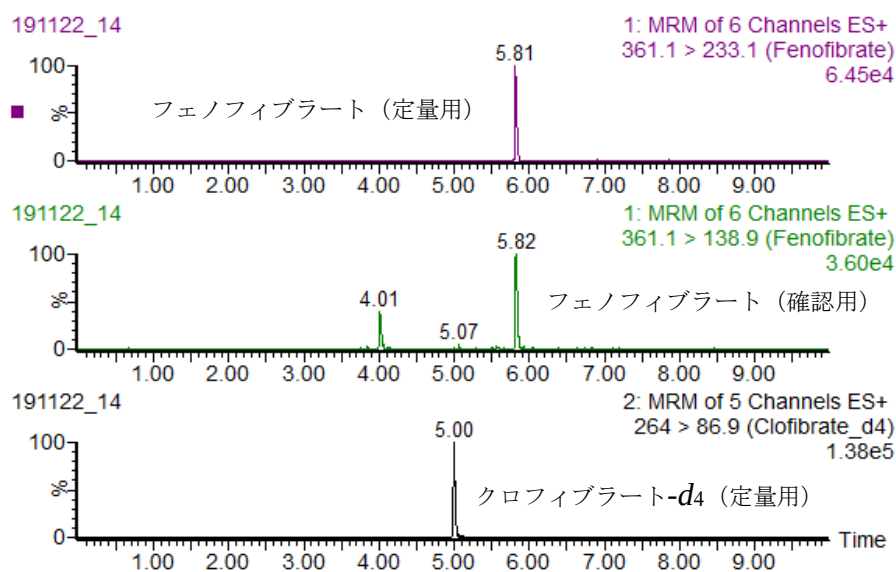


図 11-1-1 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、フェノフィブラート、添加試料)

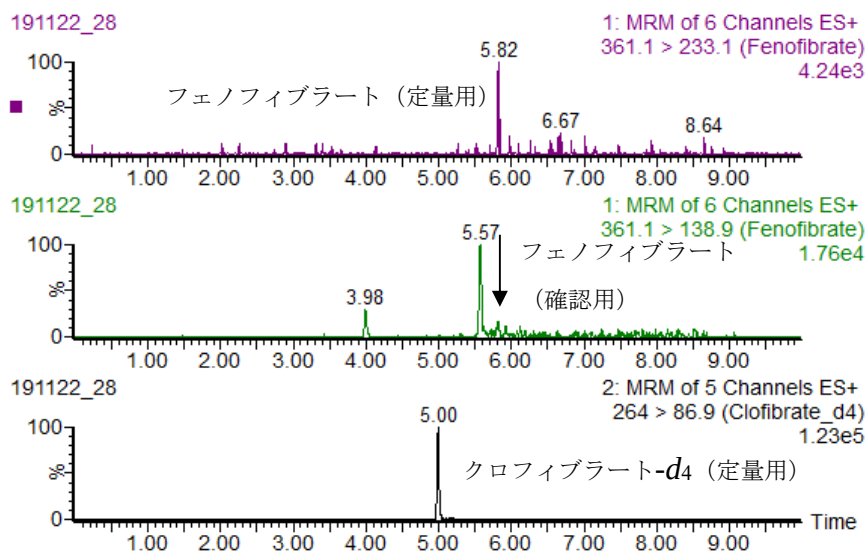


図 11-1-2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、フェノフィブラート、無添加試料)

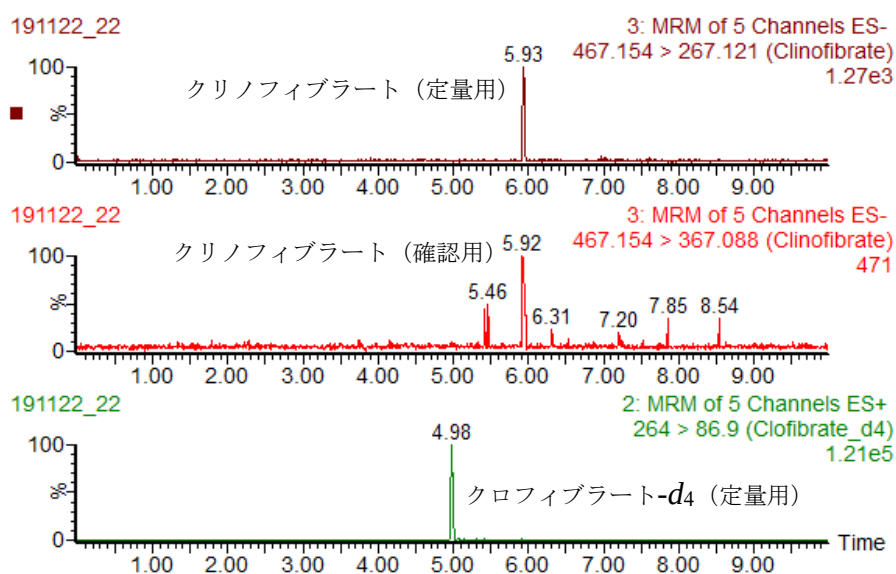


図 11-2-1 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、クリノフィブラート、添加試料)

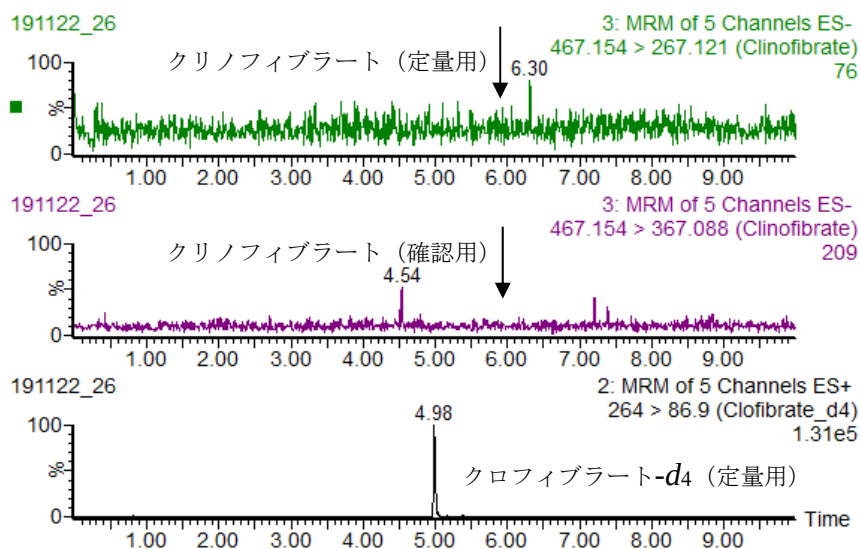


図 11-2-2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、クリノフィブラート、無添加試料)

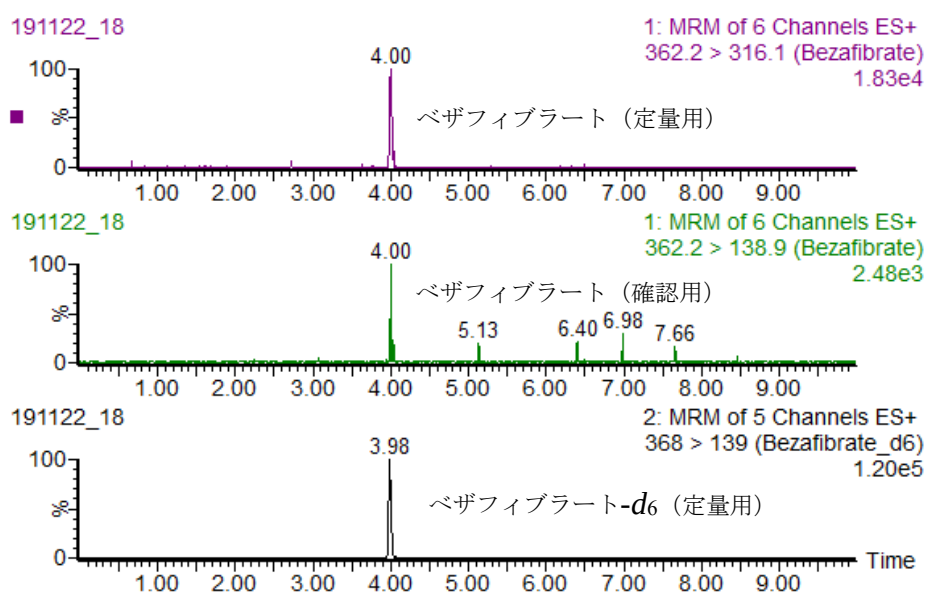


図 11-3-1 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、ベザフィブラート、添加試料)

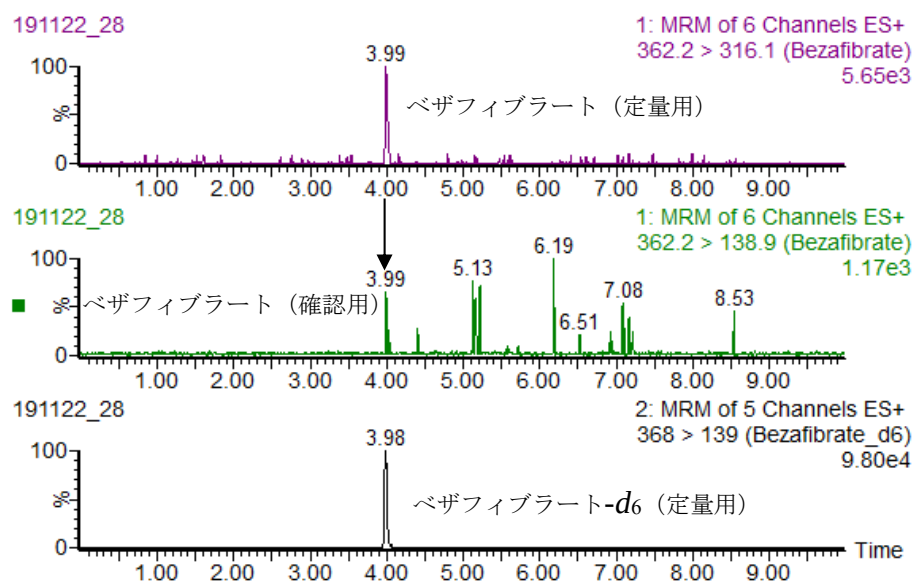


図 11-3-2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム
(海水、ベザフィブラート、無添加試料)

〔同時分析物質の分解性スクリーニング試験〕

表 13-1 フェノフィブラートの分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)			
			1 時間後	1 日後	4 日後	7 日後
5	2	5	4.8(96)	4.7(94)	4.4(87)	3.7(74)
7 (明所)	2	5	4.3(86)	4.3(86)	4.4(88)	4.3(86)
7 (暗所)	2	5	4.3(86)	4.4(88)	4.4(88)	4.4(88)
9	2	5	4.7(95)	4.6(93)	4.8(95)	4.6(92)

表 13-2 クリノフィブラートの分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)			
			1 時間後	1 日後	4 日後	7 日後
5	2	5	4.9(98)	4.9(98)	4.7(94)	4.9(98)
7 (明所)	2	5	4.9(98)	5.0(100)	4.9(99)	4.8(96)
7 (暗所)	2	5	4.9(97)	5.0(100)	5.0(101)	5.0(100)
9	2	5	4.8(96)	5.0(100)	5.0(100)	4.9(98)

表 13-3 ベザフィブラートの分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)			
			1 時間後	1 日後	4 日後	7 日後
5	2	5	5.2(104)	5.2(104)	5.2(104)	4.8(96)
7 (明所)	2	5	5.3(106)	5.1(102)	5.3(106)	4.6(91)
7 (暗所)	2	5	5.0(101)	5.2(104)	5.3(106)	4.6(91)
9	2	5	5.3(107)	5.2(105)	5.3(106)	4.1(82)

〔同時分析物質の保存性試験〕

表 14-1 フェノフィブラートの保存性試験結果

試料	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)				
			1 日後	4 日後	7 日後	14 日後	1 ヶ月後
河川水試料	2	5	4.8(95)	4.6(91)	3.8(76)	-	-
河川水粗抽出液	2	1	-	-	-	0.97(97)	-
海水試料	2	5	4.7(94)	4.6(92)	3.8(76)	-	-
海水粗抽出液	2	5	-	-	-	4.9(99)	-
標準液	2	1	-	-	-	-	1.1(105)

表 14-2 クリノフィブラートの保存性試験結果

試料	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)				
			1 日後	4 日後	7 日後	14 日後	1 ヶ月後
河川水試料	2	5	5.1(101)	5.1(101)	4.8(96)	-	-
河川水粗抽出液	2	1	-	-	-	0.97(97)	-
海水試料	2	5	5.0(101)	4.9(99)	4.7(95)	-	-
海水粗抽出液	2	5	-	-	-	5.0(100)	-
標準液	2	5	-	-	-	-	0.98(98)

表 14-3 ベザフィブラートの保存性試験結果

試料	試験 数	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率 (%)*)				
			1 日後	4 日後	7 日後	14 日後	1 ヶ月後
河川水試料	2	5	5.1(102)	5.1(101)	5.0(100)	-	-
河川水粗抽出液	2	1	-	-	-	0.98(98)	-
海水試料	2	5	4.9(100)	4.8(96)	4.8(96)	-	-
海水粗抽出液	2	5	-	-	-	4.8(97)	-
標準液	2	5	-	-	-	-	0.99(99)

〔高濃縮条件での測定の検討〕

本分析法は、試料量 100 mL から 10 倍濃縮をすることで調査要求下限値は満たすが、環境中からの検出事例は非常に少ない。そこで、さらに高濃縮することで環境中から検出することが可能になると考え、250 倍濃縮した際の各物質の回収率を算出した。

精製水 250 mL にそれぞれ、フィブラート系化合物各 100 ng とサロゲート内標準物質を添加し、本分析法の【試料の前処理及び試験液の調製】に従って前処理を行った(n=3)。溶出後は窒素気流下で 0.5 mL まで濃縮し、精製水を加えて 1 mL に定容した。

各物質の回収率を表 15 に示す。精製水を用いた場合は 250 倍濃縮時も回収率の大きな減少は見られなかった。

表 15 精製水 250 倍濃縮時の各物質の回収率(%)

試験 番号	クロフィブ ラート	クロフィ ブリン酸	フェノフィ ブラート	クリノフィ ブラート	ベザフィブ ラート
#1	98	92	116	119	101
#2	93	91	112	114	97
#3	99	93	111	111	97

同様に 30 検体の名古屋市内の環境水試料を 250 倍濃縮をした際のサロゲート物質の回収率を表 16 に示す。クロフィブラートは環境水中のマトリックスの影響を受けやすいせい、一部の試料においてサロゲート回収率が 70%を下回ったが、30 検体の回収率を平均すると 83%程度となり、高濃縮しても分析はおおむね可能であると思われる。クロフィブリン酸及びベザフィブラートについても問題なく分析が可能である。

表 16 250 倍濃縮した名古屋市環境水（30 検体）測定時のサロゲート回収率(%)

物質名	クロフィブラート- d_4	クロフィブリン酸- d_4	ベザフィブラート- d_6
最高値	96	106	99
最低値	68	84	82
平均値	83	98	92

なお、この方法で名古屋市内の環境水を分析した結果、数地点において、フィブラート系化合物が検出された（表 17）。検出時のクロマトグラムを図 12 に示す。

表 17 250 倍濃縮時の名古屋市内環境水の測定結果

物質名	クロフィブ ラート	クロフィブ リン酸	フェノフィ ブラート	クリノフィ ブラート	ベザフィブ ラート
最高値 (ng/L)	ND	20.2	1.92	2.44	362
最低値 (ng/L)	ND	ND	ND	ND	2.36
検出数 (30 検体中)	0/30	9/30	8/30	10/30	30/30
検出率 (%)	0	30	27	33	100

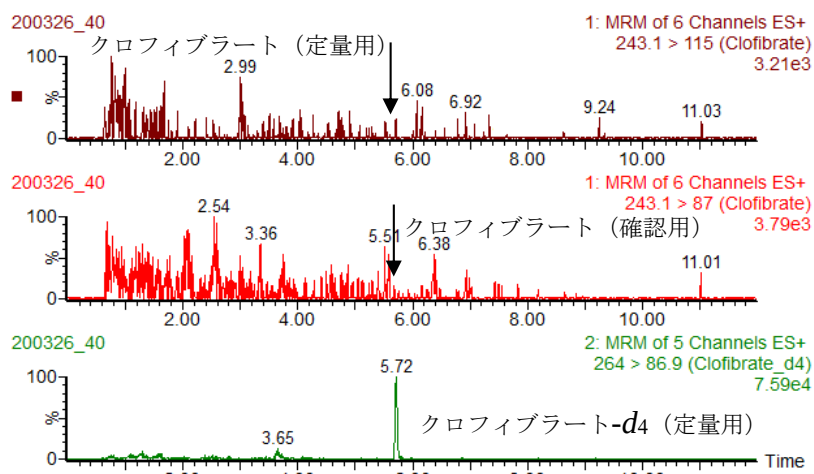


図 12-1 名古屋市内河川水中クロフィブラートのクロマトグラム
(250 倍濃縮、新堀川・舞鶴橋)

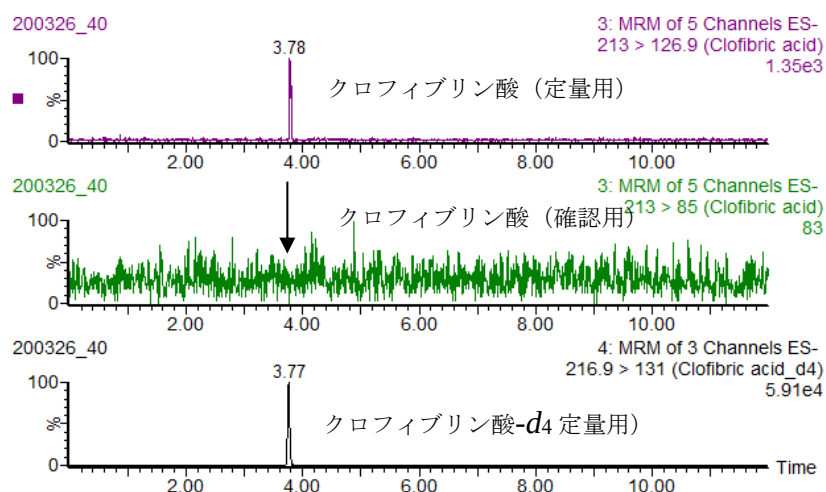


図 12-2 名古屋市内河川水中クロフィブリン酸のクロマトグラム
(250 倍濃縮、新堀川・舞鶴橋)

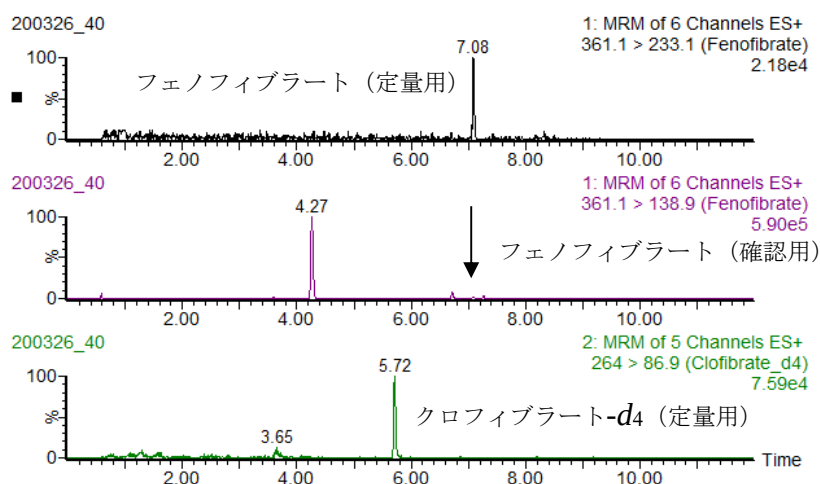


図 12-3 名古屋市内河川水中フェノフィブラートのクロマトグラム
(250 倍濃縮、新堀川・舞鶴橋)

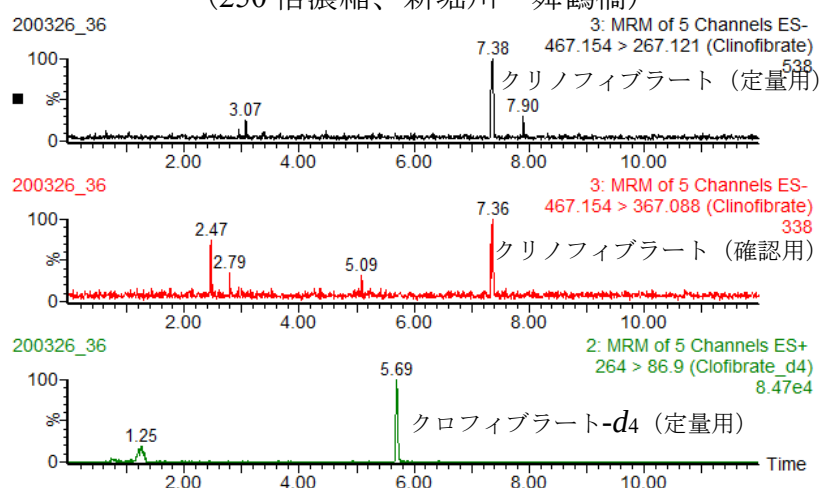


図 12-4 名古屋市内河川水中クリノフィブラートのクロマトグラム
(250 倍濃縮、堀川・紀左エ門橋)

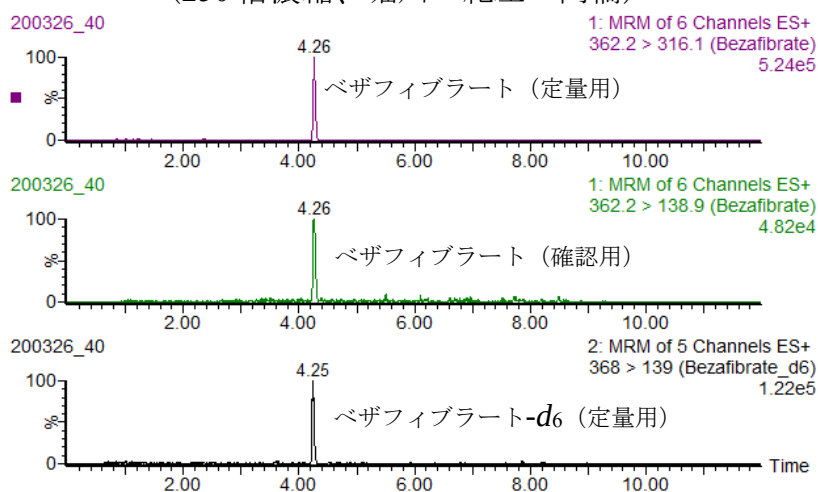


図 12-5 名古屋市内河川水中ベザフィブラートのクロマトグラム
(250 倍濃縮、新堀川・舞鶴橋)

【評価】

環境水中に含まれるクロフィブラート及びクロフィブリン酸の分析法を開発した。本法におけるクロフィブラートのMDLは河川水で0.015 µg/L、海水で0.028 µg/L、MQLは河川水で0.040 µg/L、海水で0.074 µg/Lであった。環境試料への添加回収試験における回収率は河川水で99%（サロゲート回収率89%）、海水で103%（サロゲート回収率91%）であった。また、クロフィブリン酸のMDLは河川水で0.022 µg/L、海水で0.033 µg/L、MQLは河川水で0.059 µg/L、海水で0.088 µg/Lであった。環境試料への添加回収試験における回収率は河川水で110%（サロゲート回収率98%）、海水で106%（サロゲート回収率105%）であった。

以上の結果及び検量線最低濃度から換算して、本法は、環境水試料中の0.1 µg/L程度のクロフィブラート及びクロフィブリン酸の定量に適用可能であると判断される。

なお、本法でフェノフィブラート、クリノフィブラート及びベザフィブラートの同時分析が可能である。

【参考文献】

- 1) 「ベザフィブラートの分析法」化学物質分析法開発調査報告書(平成29年度)
- 2) 中島純夫, 札幌市衛研年報 36, 67-74 (2009)
- 3) 久保田領志, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 126, 98-103 (2008)
- 4) 小林 浩, 山梨衛公研年報 第51号 (2007)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 名古屋市環境科学調査センター
所属先住所 : 〒457-0841 名古屋市南区豊田 5-16-8
TEL : 052-692-8481 FAX : 052-692-8483
担当者名 : 長谷川瞳、平生進吾
E-mail : hitomi@ncies.net、hirao@ncies.net

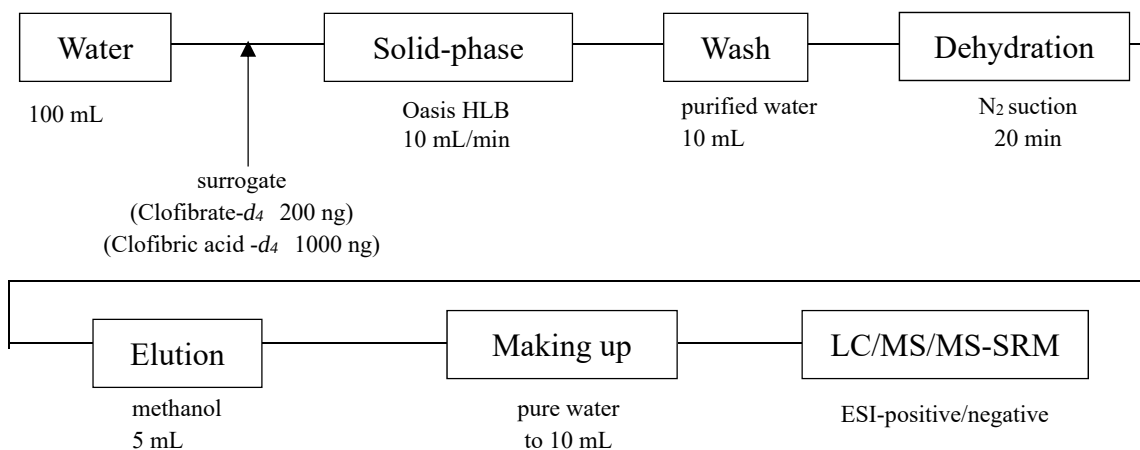
Clofibrate, Clofibric acid

This method has been developed for the quantitative determination of clofibrate and clofibric acid in water sample by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS). Clofibrate and clofibric acid are determined by selected reaction monitoring (SRM) with precursor/production transitions in positive mode at m/z 243.1 > 87.0 (Clofibrate), m/z 213.0 > 126.9 (Clofibric acid).

A 100 mL of water sample is spiked with 200 ng of clofibrate- d_4 and 1000 ng of clofibric acid- d_4 as surrogates (internal standards). The sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB) at a flow rate of 10 mL/min. After washing the cartridge with 10 mL of purified water, the target compound collected on the cartridge is eluted with 5 mL of methanol. The eluate is made the volume up to 10 mL with pure water, and the target compound is analyzed.

The method detection limits (MDL) of clofibrate in seawater is 0.028 $\mu\text{g/L}$, and the method quantification limits (MQL) of that compounds is 0.074 $\mu\text{g/L}$. The method detection limits (MDL) of clofibric acid in seawater is 0.033 $\mu\text{g/L}$, and the method quantification limits (MQL) of that compounds is 0.088 $\mu\text{g/L}$. The average recovery of clofibrate added to river water was 99%, and that added to seawater was 103%. The average recovery of clofibric acid added to river water was 110%, and that added to seawater was 106%.

Using this method, the target compound was not detected in river and seawater samples in Nagoya city.



物質名	分析法フローチャート	備 考
クロフィブラート クロフィ布林酸	【水質】 <pre> graph TD A[水質試料 100 mL] --> B[固相抽出 Oasis HLB 10 mL/min] B -- "サロゲート内標準添加 (クロフィブラート-d4 200 ng) (クロフィ布林酸-d4 1000 ng)" --> A B --> C[洗浄 精製水 10 mL] C --> D[脱水 窒素通気 乾燥 20 分] D --> E[溶出 メタノール 5 mL] E --> F[定容 精製水 10 mL] F --> G[LC/MS/MS-SRM ESI-Positive/Negative] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive/ negative 検出下限値： クロフィブラート 【水質（河川水）】 0.015 µg/L 【水質（海水）】 0.028 µg/L クロフィ布林酸 【水質（河川水）】 0.022 µg/L 【水質（海水）】 0.033 µg/L 分析機器 LC： Waters 製 Acquity H-class MS： Waters 製 Xevo TQD カラム Waters 製 CORTECS C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 µm)

ジブタン-1-イル=フタレート

Dibutan-1-yl phthalate

別名：フタル酸ジ-*n*-ブチル

Di-*n*-butyl phthalate

ジヘキサン-1-イル=フタレート

Dihexan-1-yl phthalate

別名：フタル酸ジ-*n*-ヘキシル

Di-*n*-hexyl phthalate

フタル酸ジ-*n*-オクチル

Di (n-octyl) phthalate

ビス(2-エチルヘキサン-1-イル)=フタレート

Bis(2-ethylhexan-1-yl) phthalate

別名：フタル酸ジ (2-エチルヘキシル)

Di (2-ethylhexyl) phthalate

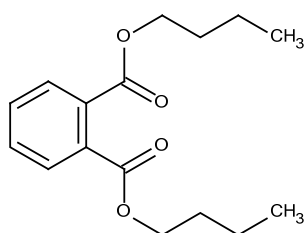
ジイソオクチル=フタレート

Diisooctyl phthalate

別名：フタル酸ジイソオクチル

Diisooctyl phthalate

【対象物質の構造】

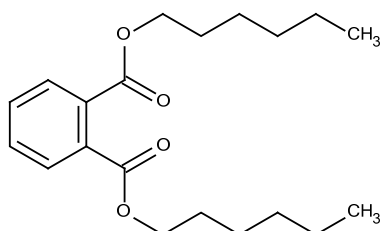


ジブタン-1-イル=フタレート

(以下：DBP)

CAS番号：84-74-2

分子式：C₁₆H₂₂O₄

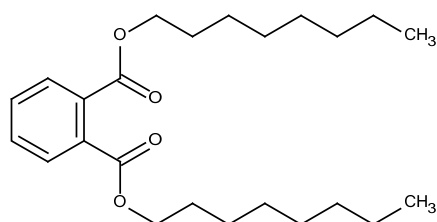


ジヘキサン-1-イル=フタレート

(DnHP)

CAS番号：84-75-3

分子式：C₂₀H₃₀O₄

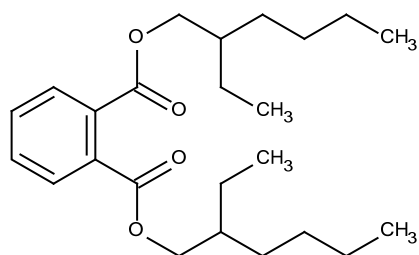


フタル酸ジ-*n*-オクチル

(DnOP)

CAS番号：117-84-0

分子式：C₂₄H₃₈O₄



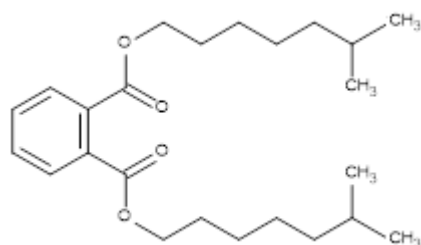
ビス(2-エチルヘキサン-1-

イル)=フタレート

(DEHP)

CAS番号：117-81-7

分子式：C₂₄H₃₈O₄



ジイソオクチル=フタレート

(DIOP)

CAS番号：27554-26-3

分子式：C₂₄H₃₈O₄

※分岐鎖の異なる異性体混合物

本分析法では、異性体のDEHP

及びDnOPとの合算

【物理化学的性状】^{1), 2)}

項目	DBP	DnHP	DnOP	DIOP	DEHP
分子量	278.35	334.45	390.56	390.56	390.56
モノアイソトピック質量	278.1518	334.2144	390.2770	390.2770	390.2770
沸点	340°C	-	390°C	370°C	386°C
融点	-35°C	-	-25°C	-45°C	-55°C
水溶解度	400 mg/L (25°C)	-	3 mg/L (25°C)	不溶	1 mg/L (25°C)
ヘンリー定数 (Pa・m ³ /mole)	1.83E-01	-	-	-	2.74E-02
log P _{ow}	4.72	-	8.10	3-4	7.74

【毒性、用途】¹⁾

〔実験動物に対する急性毒性情報〕 (LD₅₀, mg/kg)

・ DBP

投与経路／動物	ラット	マウス	ウサギ
経口	3000～8000	20000以上	-
経皮	-	-	20000以上
腹腔内	3050	4000	-

・ DnOP

投与経路／動物	マウス	ラット	モルモット
経口	1300未満～13000	30000～53700	-
経皮	-	-	4890
腹腔内	14190～65700	48900	-

・ DEHP

投与経路／動物	ラット	マウス	ウサギ	モルモット
経口	25000～34000	26000～49000	24750～30600	26300
経皮	-	-	25000	10000

〔用途〕

・ DnBP³⁾

塗料、顔料、接着剤、合成レザー・塩化ビニル樹脂可塑剤、香料の溶剤、織物用潤滑剤、ゴム練り加工剤、農薬の補助剤

・ DnHP⁴⁾、DnOP⁵⁾

可塑剤

・ DEHP³⁾

塩化ビニル樹脂可塑剤、塗料・顔料・接着剤溶剤

・ DIOP⁵⁾

ビニル樹脂・繊維素樹脂などの可塑剤

出典

1) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

2) 富士フイルム和光純薬、安全データシート

3) NITE初期リスク評価書

4) NITE調査

5) 化学工業日報社

3～5)は、独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム(CHRIP)から引用

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準を加え、ヘキサンを加えて液液抽出する。ヘキサン層を 2 分して、一方は窒素気流下で濃縮してからシリンジスパイクを加えて GC/MS-SIM で、DBP、DnHP、DEHP 及び DnOP を定量する。もう一方は窒素気流下で濃縮してメタノールに転溶して、LC/Q-TOFMS (ESI+) (注 1) で DIOP (DEHP・DnOP 合算) を測定する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

フタル酸ジ <i>n</i> -ブチル	： 関東化学製（環境分析用）
フタル酸ジ <i>n</i> -ヘキシル	： 関東化学製（環境分析用）
フタル酸ジ <i>n</i> -オクチル	： 富士フイルム和光純薬製（フタル酸エステル試験用）
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	： 関東化学製（環境分析用）
フタル酸ジイソオクチル	： 関東化学製（環境分析用、異性体混合品）
フタル酸ジ <i>n</i> -ブチル-3,4,5,6- <i>d</i> ₄	： 関東化学製（環境分析用）

フタル酸ジ n -ヘキシル- d_4	: 富士フイルム和光純薬製（フタル酸エステル試験用）
フタル酸ジ n -オクチル- d_4	: 富士フイルム和光純薬製（環境分析用）
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル- d_4	: 関東化学製（環境分析用）
p -テルフェニル- d_{14}	: 富士フイルム和光純薬製（環境分析用）
ヘキサン ^{*1}	: 関東化学製（フタル酸エステル試験用）
ヘキサン ^{*2}	: 関東化学製（残留農薬試験PCB試験用5000倍濃縮）
アセトン ^{*1}	: 関東化学製（フタル酸エステル試験用）
アセトン ^{*2}	: 関東化学製（残留農薬試験PCB試験用5000倍濃縮）
メタノール ^{*1}	: 関東化学製（フタル酸エステル試験用）
メタノール -Plus- ^{*3}	: 関東化学製（LC/MS用）
蒸留水（ヘキサン洗浄品） ^{*1}	: 関東化学製（残留農薬試験用）
蒸留水 -Plus- ^{*3}	: 関東化学製（LC/MS用）
Milli-Q水 ^{*2}	: Merck Millipore製純水製造装置により精製された水
1 mol/Lギ酸アンモニウム水溶液	: 関東化学製（高速液体クロマトグラフィー用）

*1：試薬の調製、試料の前処理及び器具の最終洗浄に用いた。

*2：器具洗浄に用いた。

*3：LC/MS移動相に用いた。

【LC/MS 移動相の調製】

1 mol/L ギ酸アンモニウム水溶液 16 mL を 1 L メスシリンダーに取り、蒸留水を 150 mL の標線まで加える。そこへメタノールを 1 L の標線まで加え、よく攪拌して、移動相とする。ギ酸アンモニウムは吸湿性のため、固体から計量すると微妙な濃度の違いが出て、保持時間のずれが生じるため、このように、溶液から調製することが望ましい。

【標準液の調製】

標準液等の調製には、必ず新品の溶媒またはフタル酸エステルに汚染されていないことを確認済の溶媒を使用すること。

〔標準液〕

各フタル酸エステルの標準品を正確に 10.0 mg 量り取り、アセトンで希釈して 10 mL とし、1000 µg/mL の標準原液を調製する。GC/MS での同時分析用は、標

準原液を DBP : DnHP : DEHP : DnOP = 1:2:5:3 の割合で混合し、ヘキサンで希釈して、各濃度が DBP 1.0 µg/mL、DnHP 2.0 µg/mL、DEHP 5.0 µg/mL 及び DnOP 3.0 µg/mL となる混合標準液を調製する。

〔サロゲート内標準液〕

各フタル酸エステル-*d*₄ の標準品を正確に 10.0 mg 量り取り、アセトンで希釈して 10 mL とし、1000 µg/mL のサロゲート内標準原液とする。サロゲート内標準原液を DBP-*d*₄ : DnHP-*d*₄ : DEHP-*d*₄ : DnOP-*d*₄ = 1:2:5:3 の割合で混合した後、アセトンで希釈して、各濃度が DBP-*d*₄ 1.0 µg/mL、DnHP-*d*₄ 2.0 µg/mL、DEHP-*d*₄ 5.0 µg/mL 及び DnOP-*d*₄ 3.0 µg/mL になるようにサロゲート混合内標準液を調製する。

〔シリンジスパイク標準液〕

p-テルフェニル-*d*₁₄ の標準品を正確に 10.0 mg 量り取り、アセトンで希釈して 10 mL とし、1000 µg/mL のシリンジスパイク標準原液とする。シリンジスパイク標準原液をヘキサンで希釈して、1.0 µg/mL のシリンジスパイク標準液を調製する。

〔GC/MS 用検量線用標準液〕 (DBP・DnHP・DEHP・DnOP 混合標準液)

※検量線用標準液は、時間が経つにつれて、容器からのフタル酸エステルの溶出により、濃度が変化する可能性があるため、この項目の操作は、1 分析ごとに、出来るだけ使用直前に行うこと。次の分析に使用してはならない。

混合標準液を、ヘキサンで順次希釈し、各濃度範囲が DBP : 0.50～100 ng/mL、DnHP : 1.0～200 ng/mL、DEHP : 2.5～500 ng/mL、DnOP : 1.5～300 ng/mL、となる検量線用標準液を調製する。検量線用標準液には、1 mL あたり、サロゲート内標準液 10 µL とシリンジスパイク標準液を 10 µL 添加して各濃度が DBP-*d*₄ 10 ng/mL、DnHP-*d*₄ 20 ng/mL、DEHP-*d*₄ 50 ng/mL、DnOP-*d*₄ 30 ng/mL、*p*-テルフェニル-*d*₁₄ 20 ng/mL となるように調製する。

〔LC/MS 用検量線用標準液〕 (DIOP 標準液)

※検量線用標準液は、時間が経つにつれて、容器からのフタル酸エステルの溶出により、濃度が変化する可能性があるため、この項目の操作は、1 分析ごとに、出来るだけ使用直前に行うこと。次の分析に使用してはならない。

標準原液をメタノールで順次希釈し、10～1000 ng/mL の検量線用標準液を調製する。サロゲート法で定量を行う場合は、GC/MS 用のサロゲート内標準液を 1 mL あたり 10 µL 添加して DEHP-*d*₄ 50 ng/mL、DnOP-*d*₄ 30 ng/mL となるように

調製する。

【器具】

ホールピペット、パスツールピペット、マイクロシリンジ、スピッツ管、メスシリンダーなどは、通常使用されているガラス製のものを使用する。(注2)

バイアルインサート : 使用する場合は、樹脂製の脚の無いものを使用
アルミホイル : バイアルのセプタムのかわりに使用する。雰囲気からの汚染を防ぐためにつけるもので、気密性はほとんどないため、バイアルを振る場合等は注意を要する。実験用は厚いものがあるので、家庭用を推奨する。

PFA製試料採取容器 : アズワン製 酸洗浄パック細口タイプ

GC/MS注入口用セプタム : SPELCO製のサーモグリーンLB-2セプタム(注3)

活性炭 : 顆粒状のもの。細いガラス管に活性炭を充填し、窒素を流しながら150°Cで2時間加熱し、そのまま室温まで冷却したものを試料濃縮時の窒素の精製に使用する。

ニトリル手袋 : 手指からの汚染を防止するために使用するが、ニトリル手袋からも汚染することがあるので、細心の注意をもって使用すること。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

水質試料は、PFA 製容器(100 mL) (アズワン製 酸洗浄パック細口タイプ) に採取する。個包装になっているため、採取直前に開封し、共洗いせずに使用する。100 mL の線まで採取し、すぐにアルミホイル等で遮光する。なお、この PFA 製容器は対象物質をととても吸着しやすいため、試料水を足して線に合わせることに。

正確な試料量は、抽出操作後にメスシリンダーで測定する。

その他は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従う。

【使用器具の洗浄】

・スピッツ管等、通常再利用することを前提にしている器具で、硝酸に浸け置きできる器具類

: 硝酸槽つけ置き3日以上(注4)。使用前にMilli-Q水、アセトン(2回、グレ

ードは低くても可)、ヘキサン (2回、フタル酸エステル試験用) の順に洗浄し、軽くヘキサンをきったものをすぐ使用する。

- ・バイアル (新品)、バイアルインサート (新品)、GC/MSライナ
: ヘキサンに浸け置く (グレードは低くても可)。使用直前にヘキサンから取り出し、アセトン (2回、グレードは低くても可)、ヘキサン (2回、フタル酸エステル試験用)、LC/Q-TOFMS用は更にメタノール (1回、フタル酸エステル試験用) で洗浄し、軽く溶媒をきってからすぐ使用する (GC/MSライナは、ヘキサンが揮発したらすぐに交換する。)。バイアルにセプタムは使用せず、バイアルの口をヘキサンで拭いたアルミホイルで覆い、セプタムを外したキャップで止める等、アルミホイルが外れないようにする。
- ・その他パストツールピペットやマイクロシリンジ等
: 使用直前にアセトン (2回、グレードは低くても可)、ヘキサン (2回、フタル酸エステル試験用) の順で洗浄し、その後、使用する溶媒に応じて、アセトン (GC/MS用) またはアセトン、メタノールの順 (LC/Q-TOFMS用) に洗浄し、溶媒をきったものをすぐ使用する。
- ・GC/MS注入口のセプタムはヘキサンで軽く洗浄してから使用しているが、ロットやメーカーによって汚染されている (または含有量が多い) 場合があるので、必ず事前に確認を行っておく。なお、焼きだしの検討も行ったが、有意な結果は得られなかったため、本分析法では行っていない。
- ・洗浄した器具等は、時間が経つにつれて雰囲気から汚染するので、すぐに使用すること。

【試料の前処理及び試験液の調製】

※ヘキサン及びメタノールは、未開封の新品を使用すること。

※前処理操作開始後は、時間を置かずに機器分析まで行うこと。

※スピッツ管で濃縮して5分の2の容量にする必要があるため、あらかじめ、抽出後の採取予定量とその5分の2の容量の位置を確認し、目印をつけておくこと。

試料水100 mLを採取したPFA製試料採取容器に、サロゲート混合内標準液 (DBP-d₄ 1.0 µg/mL、DnHP-d₄ 2.0 µg/mL、DEHP-d₄ 5.0 µg/mL及びDnOP-d₄ 3.0 µg/mL) を20 µL添加し、十分に混和した後、ヘキサンを正確に5 mL加える。PFA容器を5分間手でよく振とうして抽出する。このとき、PFA容器に空隙が少ないため、十分に混合できるよう気を付けること。十分に混合できれば、振とう機等を使用してもかまわない (注5)。振とう後、しばらく静置する。パストツールピペット等で、GC/MS分析試料として上層のヘキサン層をスピッツ管に1 mL以上分

取し、残りのヘキサン層をLC/Q-TOFMS分析試料として別のスピッツ管に1 mL以上分取する。このとき、ヘキサン層がPFA容器の壁面に吸着するので、PFA 容器を再び軽く振とうさせる等して、できるだけヘキサン層を分取し、各分析用試料として1 mL以上分取できるようにする（注6）。試料は、室温下、活性炭を通した窒素気流下で濃縮する。GC/MS分析試料は分取量の5分の2の量まで濃縮し、シリンジスパイク標準液(1.0 µg/mL)を濃縮試料1 mLあたり10 µLを加えて試験液とする。LC/Q-TOFMS分析試料は、乾固直前まで濃縮してから、分取した量の5分の2の容量までメタノールを加えて攪拌し、試験液とする。

【空試験液の調製】

試料水と同量の蒸留水（ヘキサン洗浄品）を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

空試験に使用する水に Milli-Q 水を使用すると、Milli-Q 水のタンク等から溶出したフタル酸エステル類が溶け込んでいる場合があるので、必ずヘキサン洗浄した蒸留水を使用する。

【測定】（注7）

【GC/MS測定条件】（DBP・DnHP・DEHP・DnOP同時測定分）

〔GC条件〕

使用機種 : Agilent製7890B
カラム : GL Science製 InertCap 1MS (30 m×0.25 mm, 0.25 µm)
カラム温度 : 50°C (2 min) → 30°C/min → 190°C → 5°C/min → 270°C → 30°C/min → 310°C (3 min)
注入方法 : スプリットレス
注入口温度 : 250°C
注入量 : 1.0 µL

〔MS条件〕

使用機種 : 日本電子製 JMS-Q1500GC
イオン化法 : EI
インターフェース温度 : 280°C
イオン源温度 : 230°C
測定モード : SIM法

物質名	モニターイオン(<i>m/z</i>)
DBP	149 (定量用)、223 (確認用)
DBP- <i>d</i> ₄	153 (定量用)、227 (確認用)
DnHP	149 (定量用)、251 (確認用)
DnHP- <i>d</i> ₄	153 (定量用)、255 (確認用)
DEHP	149 (定量用)、167 (確認用)
DEHP- <i>d</i> ₄	153 (定量用)、171 (確認用)
DnOP	149 (定量用)、279 (確認用)
DnOP- <i>d</i> ₄	153 (定量用)、283 (確認用)
<i>p</i> -テルフェニル- <i>d</i> ₁₄	244

〔LC/Q-TOFMS測定条件〕(DIOP (DEHP・DnOP合算) 測定分)

〔LC 条件〕

使用機種 : Waters 製 Acquity UPLC
 カラム : Waters 製 XBridge C8
 (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)
 移動相 : 16 mmol/L ギ酸アンモニウム含有
 85%メタノール:15%蒸留水 溶液 (Isocratic)
 カラム流量 : 0.3 mL/min
 カラム温度 : 40°C
 注入量 : 10 μL
 サンプル室温度 : 10°C

〔MS 条件〕

使用機種 : Waters 製 Xevo G2-XS QTof
 キャピラリー電圧 : 3.0 kV
 イオン源温度 : 120°C
 脱溶媒温度 : 500°C
 コーンガス流量 : 50 L/h
 脱溶媒ガス流量 : 1000 L/h
 イオン化法 : ESI-positive
 測定モード : SRM
 モニターイオン : DIOP *m/z* 391.32 (M+H) > 71.08
 DEHP-*d*₄+ DnOP-*d*₄ *m/z* 395.32 (M+H) > 153.05
 コーン電圧 : 40 V
 コリジョン電圧 : 25 V

〔検量線〕

検量線用標準液（GC/MS:1.0 μL、LC/Q-TOFMS:10 μL）を装置に注入して測定する。GC/MSは対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

LC/Q-TOFMSは、対象物質の濃度と得られた面積から検量線を作成する。添加回収の回収率が低い場合やヘキサン抽出後にヘキサン層が非常に泡立った場合等、相対検量線法で定量する必要があるため、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比からも、検量線を作成しておく。

〔定量〕

試験液（GC/MS:1.0 μL、LC/Q-TOFMS:10 μL）を装置に注入し、GC/MS（DBP、DnHP、DEHP及びDnOP）は対象物質とサロゲート内標準のピーク面積比を検量線に照らして定量する。またLC/Q-TOFMS(DIOP)は、対象物質の面積から定量を行うが、参考としてDEHP-*d*₄とDnOP-*d*₄をサロゲート内標準とした合算値による相対検量線法でも定量を行う。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C (μg/L) は次式により算出する。

〔DBP、DnHP、DEHP、DnOP 及び DIOP（相対検量線）の場合〕

$$C = R \cdot Q/V$$

R : 検量線から求めた試料液中のサロゲート内標準に対する対象物質の濃度比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (μg)

(= 添加したサロゲート内標準の濃度 (μg/mL) × 添加したサロゲート内標準の容量 (mL))

V : 試料水量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

Q (μg): DBP 0.02、DnHP 0.04、DEHP 0.1、DnOP 0.06、DIOP 0.16

(= 添加したサロゲート内標準の濃度 (μg/mL) × 添加したサロゲート内標準の容量 (0.02 mL))

$V = 0.1$ (L)

即ち、

$$\text{DBP} : C = R \times 0.02 / 0.1 = 0.2 \times R \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

$$\text{DnHP} : C = R \times 0.04 / 0.1 = 0.4 \times R (\mu\text{g/L})$$

$$\text{DEHP} : C = R \times 0.1 / 0.1 = R (\mu\text{g/L})$$

$$\text{DnOP} : C = R \times 0.06 / 0.1 = 0.6 \times R (\mu\text{g/L})$$

$$\text{DIOP} : C = R \times 0.16 / 0.1 = 1.6 \times R (\mu\text{g/L})$$

である。

[DIOP（絶対検量線）の場合]

$$\text{水質試料中の濃度 } (\mu\text{g/L}) = \text{検出濃度 } (\text{ng/mL}) \times \text{最終液量 } (\text{mL}) / \text{試料量 } (\text{L}) / 1000$$

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$\text{最終液量} = 2 (\text{mL}) (= \text{抽出するヘキサンの量 } 5 (\text{mL}) \times \text{濃縮率 } 2/5)$$

$$\text{試料量} = 0.1 (\text{L})$$

即ち、

$$\begin{aligned} \text{水質試料中の濃度} (\mu\text{g/L}) &= \text{検出濃度 } (\text{ng/mL}) \times (2/5) \times 5 / 0.1 / 1000 \\ &= \text{検出濃度 } (\text{ng/mL}) / 50 \end{aligned}$$

である。

[装置検出下限値(IDL)]

本分析に用いた GC/MS 及び LC/Q-TOFMS の IDL を表 1 に示す（注 8）。

表 1-1 GC/MS による IDL の算出結果

物質名	媒体名	IDL (pg)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
DBP	水質	0.13	100	2.0	0.0025
DnHP	水質	0.14	100	2.0	0.0027
DEHP	水質	0.39	100	2.0	0.0078
DnOP	水質	0.83	100	2.0	0.017

表 1-2 LC/Q-TOFMS による IDL の算出結果

物質名	媒体名	IDL (pg)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
DIOP（相対）	水質	31	100	2.0	0.062
DIOP（絶対）	水質	27	100	2.0	0.055

DIOP（相対）：相対検量線法、DIOP（絶対）：絶対検量線法

【分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)】

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す。(注 9)

表 2-1 GC/MS による MDL 及び MQL の算出結果

物質名	媒体名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
DBP	水質 (河川)	100	2.0	0.0088	0.023
DnHP	水質 (河川)	100	2.0	0.015	0.039
DEHP	水質 (河川)	100	2.0	0.065	0.16
DnOP	水質 (河川)	100	2.0	0.021	0.055

表 2-2 LC/Q-TOFMS による MDL 及び MQL の算出結果

物質名	媒体名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
DIOP (相対)	水質 (河川)	100	2.0	0.20	0.53
DIOP (絶対)	水質 (河川)	100	2.0	0.19	0.48

DIOP (相対) : 相対検量線法、DIOP (絶対) : 絶対検量線法

注 解

- (注 1) 当研究所の機器の都合上、LC/Q-TOFMS を使用したが、通常の LC/MS/MS でも測定は可能である。
- (注 2) マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注 3) GC/MS 注入口用セプタムは Agilent 製の高性能セプタムは測定対象のフタル酸エステル類が多く検出する傾向があったため、SPELCO 製のサーモグリーン LB-2 セプタムを使用した。
- (注 4) 硝酸槽は、通常 ICP に使用するガラス器具等をつけ置くものを使用した。新たに作る場合は、硝酸(1+6) 程度を目安に調製する。
- (注 5) よく振とうできるかどうかで、回収率が大きく変わってくるので、添加回収試験を実施して確認することが望ましい。100 mL 容器に 100 mL 採取すると、容器上部の空隙があまりないので、アズワン製酸洗浄パック細口タイプの PFA 製試料採取容器の次の大きさの 250 mL 容器に 200 mL 採取して、ヘキサン 10 mL で抽出するなどにすると、振とうが十分に行え、更に、消えにくい泡が発生した時も、必要な試料量が確保しやすい。
- (注 6) ヘキサン層が泡立つ等、直接ヘキサン層が分取しにくい場合は、スピッツ管にヘキサン層と泡の部分を出来るだけ多く分取する。蓋をして、試験管ミキサーで10秒程度攪拌する。このとき、泡の影響で攪拌しにくいときは、直前に手で振るなどして、なんとか試験管ミキサーで攪拌する。攪拌後は、非常に細かい泡の部分と、ヘキサン層及び水層に分かれるので、ヘキサン層を分取する。それでも、泡の部分が多い場合は、GC/MS 分析試料分を分取した後に、メタノールを数滴加えて消泡してから、LC/Q-TOFMS 分析試料を分取する。この場合の定量は、必ず内標準法で行う。
- (注 7) ここに示した機器条件は当研究所の機器に関するものであり、測定前に必ず最適化を行うこと。
- (注 8) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って算出した。算出結果を表 3(GC/MS) 及び表 4(LC/Q-TOFMS) に、測定時のクロマトグラムを図 1(GC/MS) 及び図 2(LC/Q-TOFMS) に示す。

表3 GC/MS による IDL の算出結果 (詳細)

物質名	DBP	DnHP	DEHP	DnOP
試料量 (mL)	100	100	100	100
最終液量 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	1.0	2.5	1.5
注入量 (pg)	0.50	1.0	2.5	1.5
装置注入量 (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
結果 1 (pg)	0.574	1.081	2.45	1.75
結果 2 (pg)	0.521	1.122	2.53	1.72
結果 3 (pg)	0.490	1.089	2.38	2.16
結果 4 (pg)	0.494	1.085	2.48	2.16
結果 5 (pg)	0.472	1.065	2.33	2.14
結果 6 (pg)	0.500	1.150	2.62	1.81
結果 7 (pg)	0.503	1.151	2.56	2.13
平均値 (pg)	0.5077	1.106	2.479	1.986
標準偏差 (pg)	0.0327	0.0348	0.0999	0.214
IDL (pg)*	0.13	0.14	0.39	0.83
IDL 試料換算値 (σ_{n-1})(μg/L)	0.0025	0.0027	0.0078	0.017
S/N	5	5	8	4
CV (%)	6.4	3.1	4.0	11

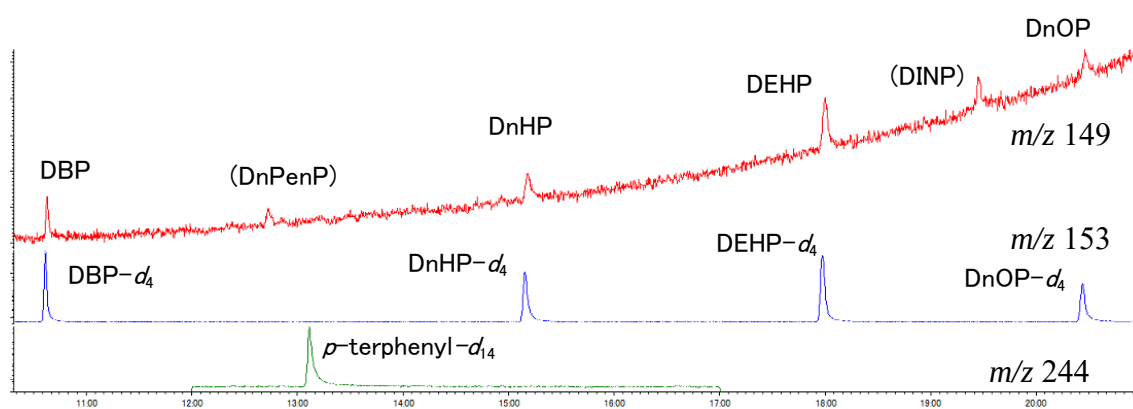
*: IDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ 

図1 IDL 測定時 (DBP 0.5 ng/mL、DBP:DnHP 1.0 ng/mL、DEHP 2.5 ng/mL、DnOP 1.5 ng/mL) のクロマトグラム

表4 LC/Q-TOFMS によるIDLの算出結果(詳細)

物質名	DIOP (相対)	DIOP (絶対)
試料量 (mL)	100	100
最終液量 (mL)	2.0	2.0
注入液濃度 (ng/mL)	10	10
注入量 (pg)	100	100
装置注入量 (μL)	10	10
結果 1 (pg)	113	104
結果 2 (pg)	113	110
結果 3 (pg)	113	102
結果 4 (pg)	112	110
結果 5 (pg)	114	110
結果 6 (pg)	111	106
結果 7 (pg)	110	102
結果 8 (pg)	89.2	88.3
平均値 (pg)	109.2	104.0
標準偏差 (pg)	8.22	7.22
IDL (pg) ^{*1}	31	27
IDL 試料換算値 (σ_{n-1})(μg/L)	0.062	0.055
S/N	5	5
CV (%)	7.5	6.9

*1: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*2: DIOP (相対) : 相対検量線法、DIOP (絶対) : 絶対検量線法

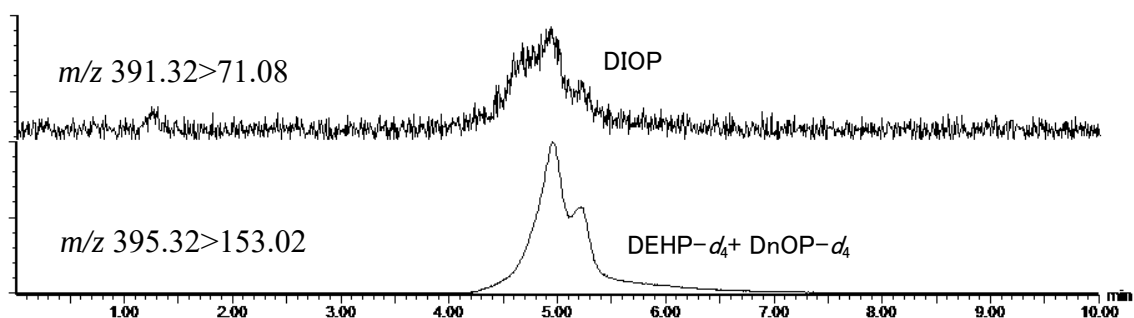


図2 IDL 測定時 (DIOP 10 ng/mL) のクロマトグラム

(注9) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成28年3月)を従って算出した。算出結果を表5～7に、測定時のクロマトグラムを図3(GC/MS)及び図4(LC/Q-TOFMS)に示す。

表5 GC/MS による MDL 及び MQL の算出結果(詳細) *1

物質名	DBP	DnHP	DEHP	DnOP
試料	河川水*2 (矢上川)	河川水*2 (矢上川)	河川水*2 (矢上川)	河川水*2 (矢上川)
試料量 (mL)	100	100	100	100
標準添加量 (ng)	2.0	4.0	10	8.0
試料換算濃度 (μg/L)	0.020	0.040	0.100	0.080
最終液量 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0
注入液濃度 (ng/mL)	1.0	2.0	5.0	4.0
注入量 (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
操作ブランク平均 (μg/L) *3	0.011	<0.015	0.088	<0.021
無添加平均 (μg/L) *4	0.011	<0.015	0.32	<0.021
結果 1 (μg/L)	0.0223	0.0310	0.308	0.0372
結果 2 (μg/L)	0.0264	0.0360	0.303	0.0483
結果 3 (μg/L)	0.0265	0.0349	0.294	0.0461
結果 4 (μg/L)	0.0236	0.0367	0.312	0.0555
結果 5 (μg/L)	0.0219	0.0341	0.298	0.0501
結果 6 (μg/L)	0.0279	0.0395	0.333	0.0469
結果 7 (μg/L)	0.0241	0.0431	0.337	0.0484
平均値 (μg/L)	0.02468	0.03646	0.3124	0.04750
標準偏差 (σ _{n-1})(μg/L)	0.00227	0.00391	0.0166	0.00550
MDL(μg/L) *5	0.0088	0.015	0.065	0.021
MQL(μg/L) *6	0.023	0.039	0.17	0.055
S/N	7	5	15	4
CV (%)	9.2	11	5.3	12

*1: 定量結果の濃度はサロゲート法により補正した値である。

*2: 矢上川の河川水をヘキサンで事前に洗浄したものを使用した。

*3: 空試験液を測定した値の平均値 (n = 2)

*4: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 2)

*5: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*6: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

表 6 GC/MS による MDL 及び MQL の算出時の対象物質のサロゲート補正後の回収率とサロゲート回収率(%)

物質名	DBP	DnHP	DEHP	DnOP
操作ブランク平均	- (94)	- (95)	- (93)	- (93)
無添加平均	- (90)	- (81)	- (60)	- (62)
結果 1	72 (96)	77 (85)	73 (80)	46 (79)
結果 2	85 (92)	90 (80)	72 (78)	60 (73)
結果 3	85 (91)	87 (75)	70 (71)	58 (75)
結果 4	76 (91)	92 (75)	74 (72)	69 (75)
結果 5	71 (99)	85 (85)	71 (76)	63 (79)
結果 6	90 (91)	99 (81)	79 (74)	59 (76)
結果 7	78 (90)	108 (76)	80 (71)	61 (79)
平均	79.6 (92.9)	91.2 (79.5)	74.4 (74.6)	59.4 (76.6)

*：カッコ内がサロゲート回収率

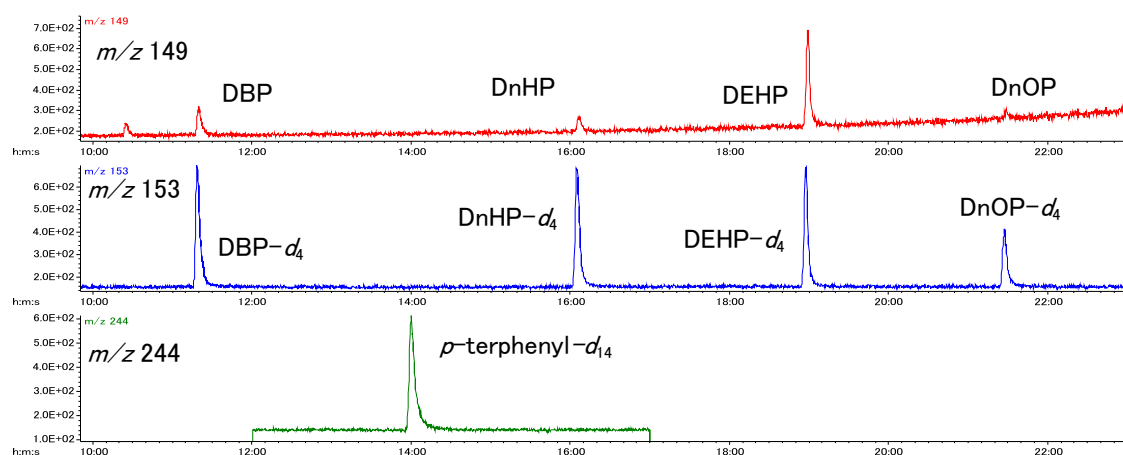


図 3 MDL 測定時のクロマトグラム (GC/MS)

表 7 LC/Q-TOFMS による MDL 及び MQL の算出結果

物質名	DIOP (絶対検量線法)	回収率 (%)	DIOP* ¹ (相対検量線法)	補正後回 収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	河川水 (多摩川* ²)	-	河川水 (多摩川* ²)	-	-
試料量 (mL)	100	-	100	-	-
標準添加量(ng)	30	-	30	-	-
試料換算濃度(μg/L)	0.30	-	0.30	-	-
最終液量(mL)	2.0	-	2.0	-	-
注入液濃度(ng/mL)	15	-	15	-	-
注入量(μL)	10	-	10	-	-
操作ブランク平均 (μg/L) * ³	<0.19	-	<0.19	-	94
無添加平均(μg/L) * ⁴	<0.19 (0.035)	-	<0.19 (0.057)	-	93
結果 1(μg/L)	0.140	47	0.334	111	72
結果 2(μg/L)	0.191	64	0.410	137	72
結果 3(μg/L)	0.140	47	0.301	100	83
結果 4(μg/L)	0.178	59	0.333	111	76
結果 5(μg/L)	0.263	88	0.346	115	78
結果 6(μg/L)	0.236	79	0.365	122	88
結果 7(μg/L)	0.230	77	0.455	152	82
平均値(μg/L)	0.1968	65.6	0.3633	121	78.0
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.0479		0.0526		
MDL(μg/L) * ⁵	0.19		0.20		
MQL(μg/L) * ⁶	0.48		0.53		
S/N	5		5		
CV(%)	24		14		

*1 : DIOP (相対検量線法) の定量結果の濃度は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 多摩川の水をヘキサンで事前に洗浄したものを使用した。DIOP は、3.0 μg/mL のメタノール溶液を調製して、試料水 100 mL に対して 10 μL 添加した。

*3 : 空試験液を測定した値の平均値 (n = 2)

*4 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 2)

*5 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*6 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

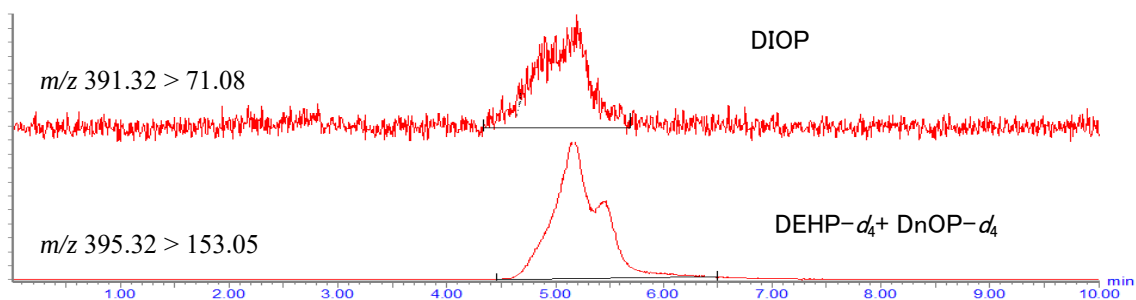


図4 DIOP の MDL 測定時のクロマトグラム
(上段 m/z 391.32 > 71.08、下段 m/z 395.32 > 153.05)

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図5に示す。

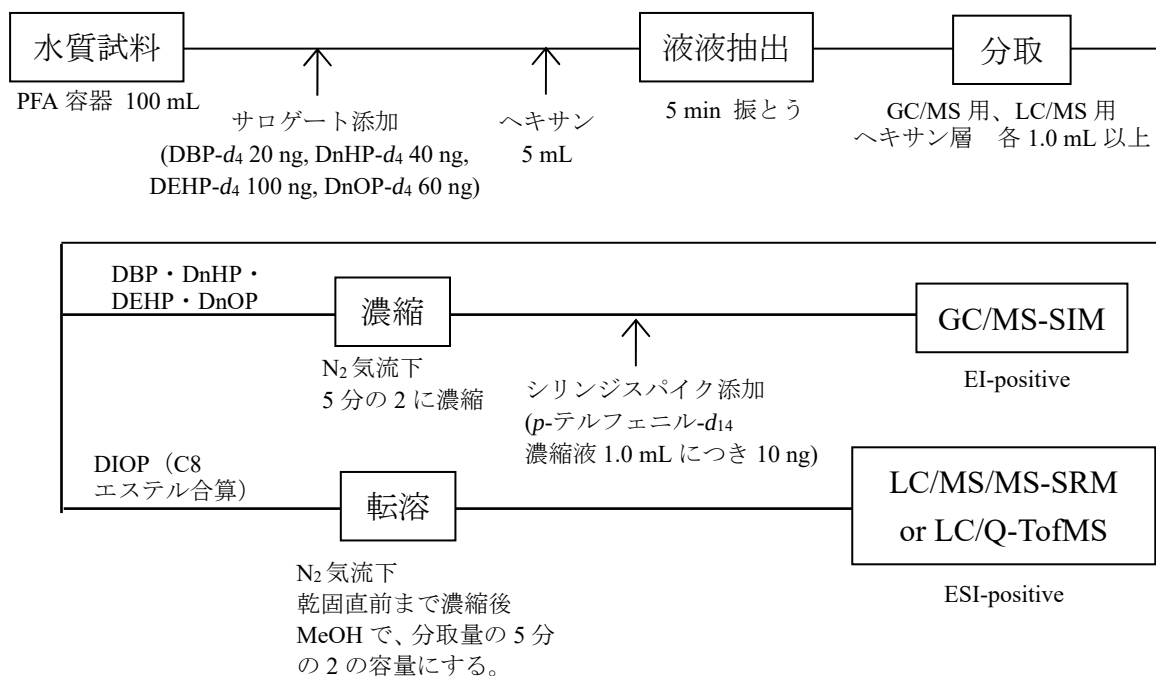


図5 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図6及び図7に、検量線作成用データを表8及び表9に示す。

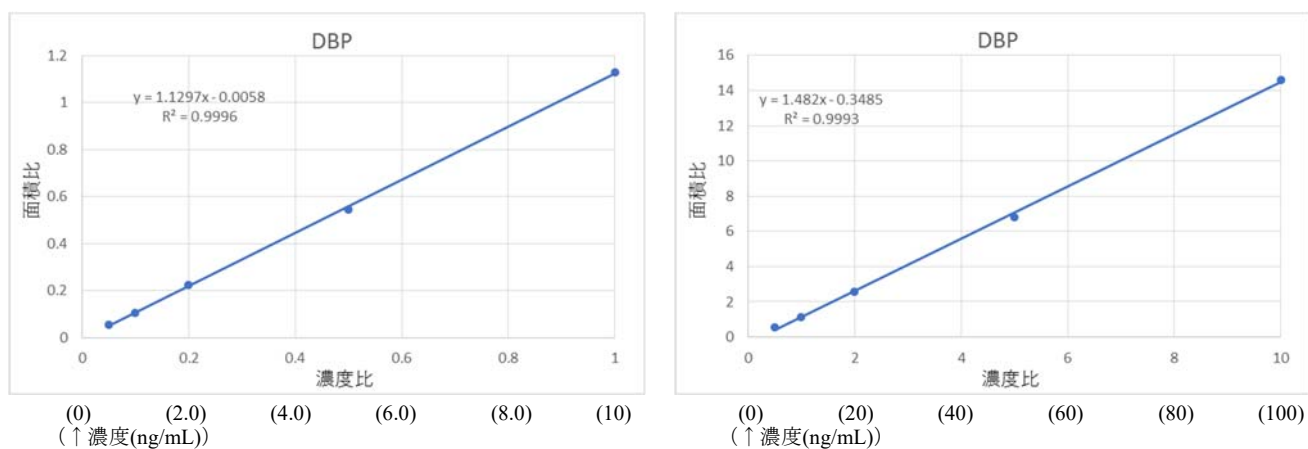


図6-1 GC/MSによる検量線 (DBP)

(左図：低濃度域 0.50~10 ng/mL、右図：高濃度域 5.0~100 ng/mL)

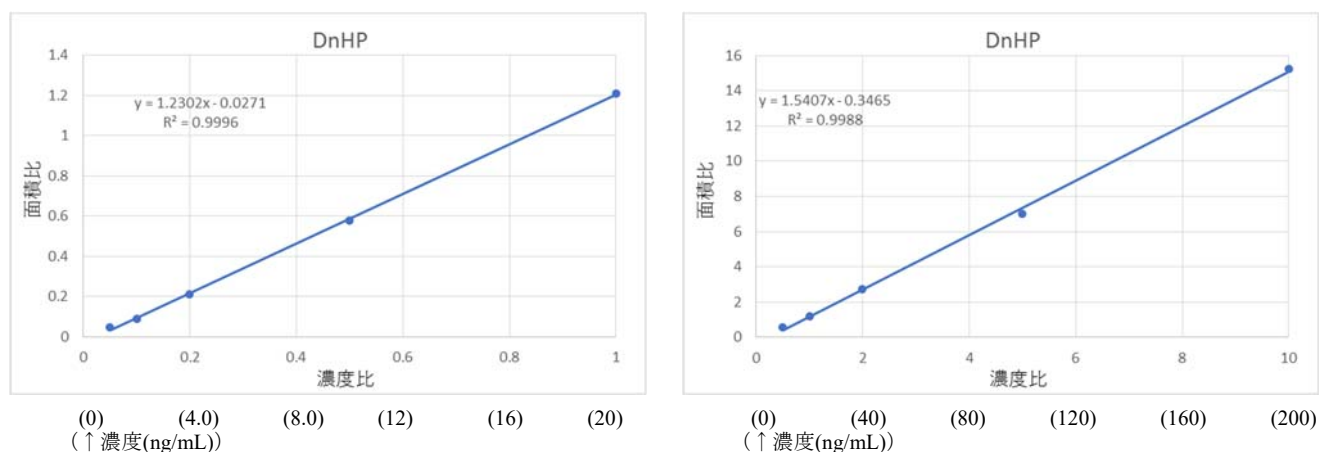


図6-2 GC/MSによる検量線 (DnHP)

(左図：低濃度域 1.0~20 ng/mL、右図：高濃度域 10~200 ng/mL)

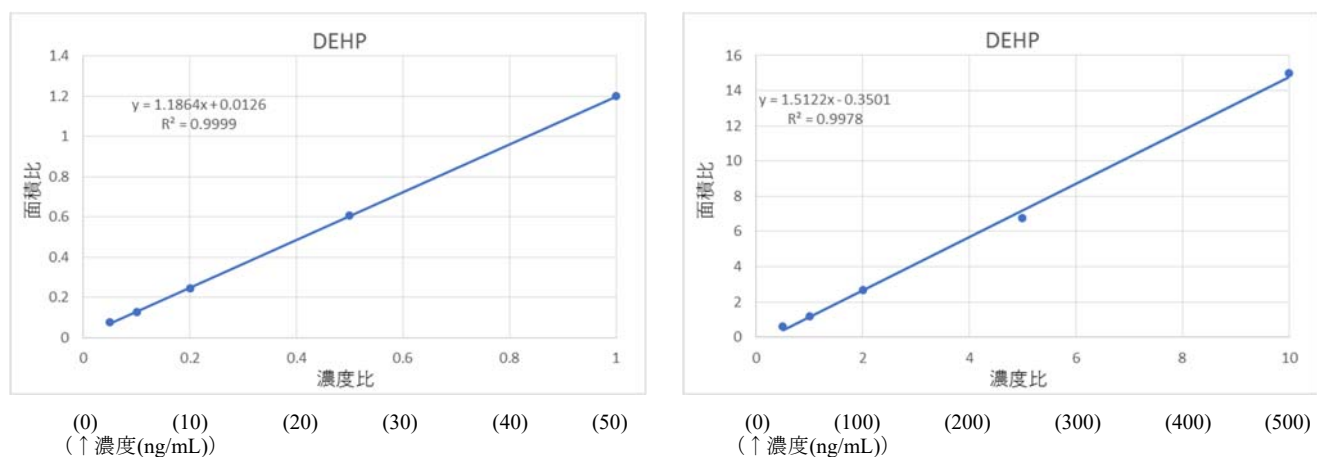


図6-3 GC/MSによる検量線 (DEHP)
(左図：低濃度域 2.5~50 ng/mL、右図：高濃度域 25~500 ng/mL)

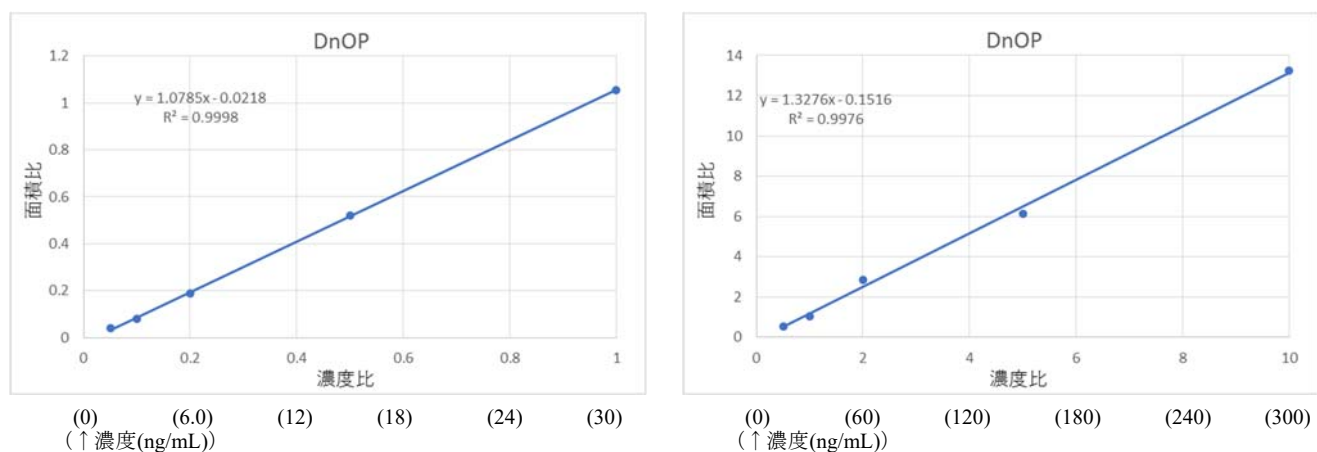


図6-4 GC/MSによる検量線 (DnOP)
(左図：低濃度域 1.5~30 ng/mL、右図：高濃度域 15~300 ng/mL)

表8-1 GC/MSによる検量線作成用データ(DBP)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s)	サロゲート内標準	
		【DBP】 (m/z 149)	準(A _{is}) 【DBP-d ₄ 】 (m/z 153)	
0.50	0.050	206	3731	0.0552
1.0	0.10	347	3323	0.1044
2.0	0.20	758	3354	0.2260
5.0	0.50	1772	3250	0.5452
10	1.0	4211	3729	1.1293
20	2.0	10250	3970	2.5819
50	5.0	30270	4431	6.8314
100	10	63204	4333	14.5867

C_{is}*:サロゲート内標準濃度 10 ng/mL

表8-2 GC/MSによる検量線作成用データ(DnHP)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s)	サロゲート内標準	
		【DnHP】 (m/z 149)	(A _{is}) 【DnHP-d ₄ 】 (m/z 153)	
1.0	0.050	205	4243	0.0483
2.0	0.10	354	3911	0.0905
4.0	0.20	825	3853	0.2141
10	0.50	2229	3848	0.5793
20	1.0	5378	4451	1.2083
40	2.0	12687	4608	2.7533
100	5.0	39549	5644	7.0073
200	10	88580	5819	15.2225

C_{is}*:サロゲート内標準濃度 20 ng/mL

表8-3 GC/MSによる検量線作成用データ(DEHP)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s)	サロゲート内標準	
		【DEHP】 (m/z 149)	(A _{is}) 【DEHP-d ₄ 】 (m/z 153)	
2.5	0.050	419	5303	0.0790
5.0	0.10	620	4864	0.1275
10	0.20	1164	4743	0.2454
25	0.50	3080	5080	0.6063
50	1.0	6510	5426	1.1998
100	2.0	16334	6082	2.6856
250	5.0	51678	7661	6.7456
500	10	122204	8153	14.9888

C_{is}*:サロゲート内標準濃度 50 ng/mL

表8-4 GC/MSによる検量線作成用データ(DnOP)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s)	サロゲート内標準	
		【DnOP】 (m/z 149)	(A _{is}) 【DnOP-d ₄ 】 (m/z 153)	
1.5	0.050	125	3176	0.0394
3.0	0.10	239	2988	0.0800
6.0	0.20	588	3107	0.1893
15	0.50	1617	3098	0.5219
30	1.0	3588	3399	1.0556
60	2.0	10546	3711	2.8418
150	5.0	30415	4952	6.1420
300	10	69073	5217	13.2400

C_{is}*:サロゲート内標準濃度 30 ng/mL

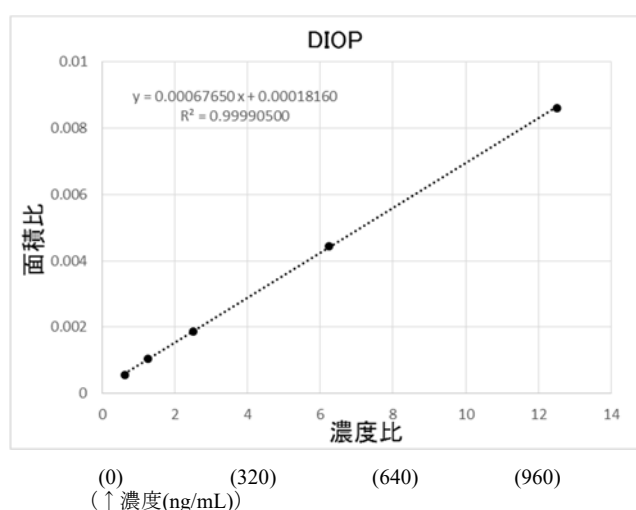
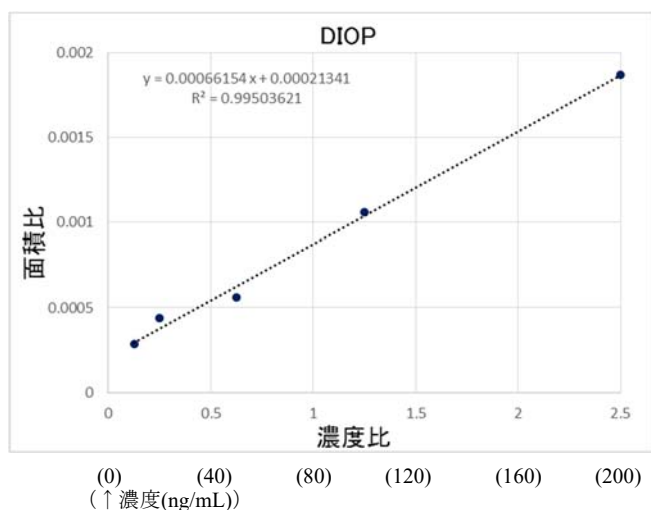


図7-1 LC/Q-TOFMS によるDIOPの検量線（相対検量線）
（左図：低濃度域 10～200 ng/mL、右図：高濃度域 50～1000 ng/mL）

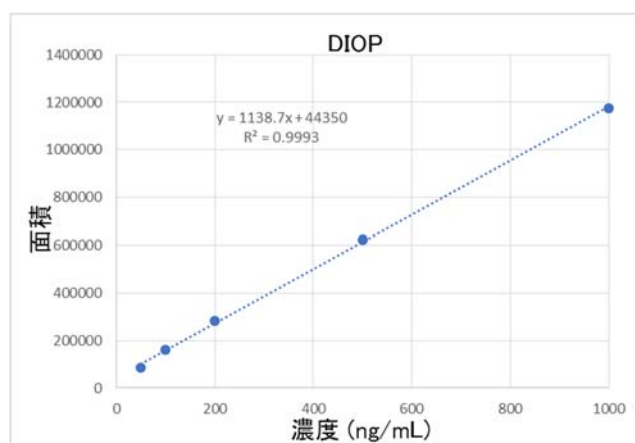
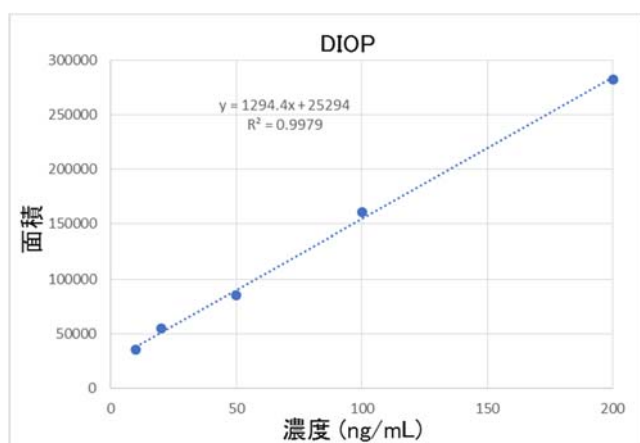


図7-2 LC/Q-TOFMS によるDIOPの検量線（絶対検量線）
（左図：低濃度域 10～200 ng/mL、右図：高濃度域 50～1000 ng/mL）

表9 LC/Q-TOFMS によるDIOPの検量線データ

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	濃度比 (C _s /C _{is} *)	応答値		応答比 (A _s /A _{is})
		対象物質(A _s) 【DIOP】 (m/z 391.32> 71.08)	サロゲート内標準 (A _{is}) 【DEHP-d ₄ + DnOP-d ₄ 】 (m/z 395.32>153.05)	
10	0.125	35558	125273344	0.0002838
20	0.250	55034	126058203	0.0004366
50	0.625	84888	151412797	0.0005606
100	1.25	160582	151638109	0.0010590
200	2.50	282282	151007563	0.0018693
500	6.25	624283	140560531	0.0044414
1000	12.5	1176287	136432578	0.0086217

C_{is}*:サロゲート内標準濃度:DEHP-d₄ 50 ng/mL、DnOP-d₄ 30 ng/mL

〔マススペクトル〕

各物質の GC/MS マススペクトル及び LC/Q-TOFMS の各プロダクトイオンのスペクトルを図 8～10 に示す。

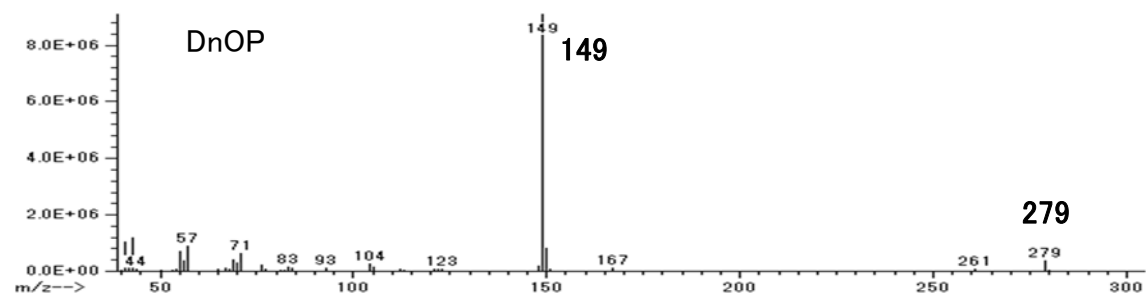
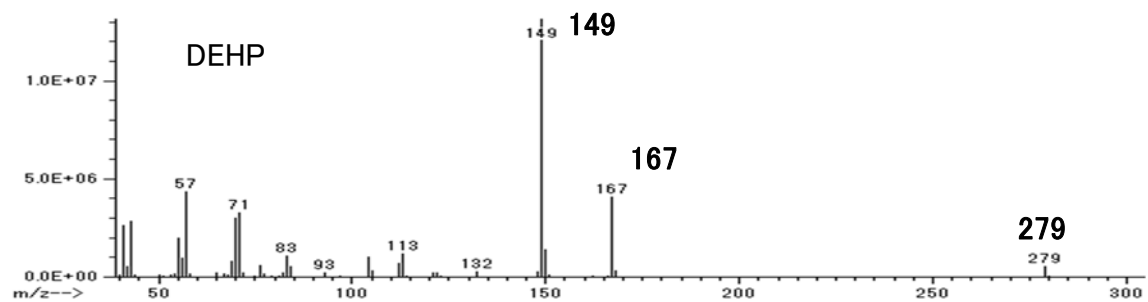
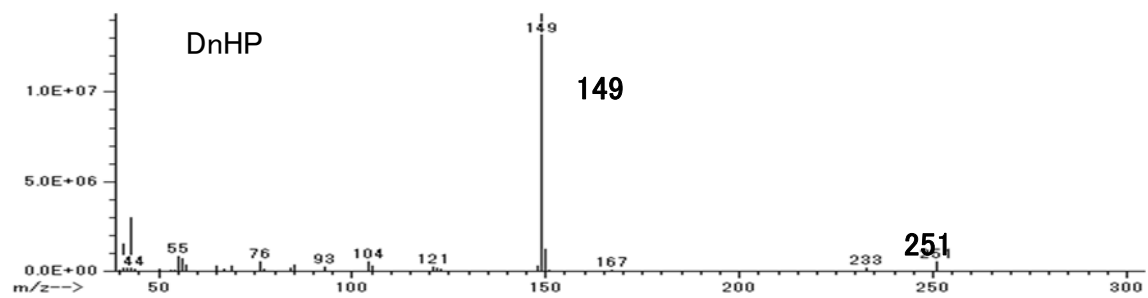
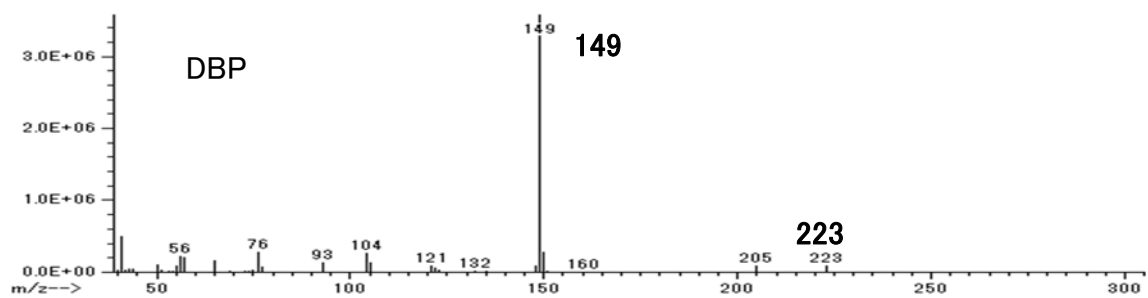


図8-1 各物質のGC/MSスペクトル(EI)

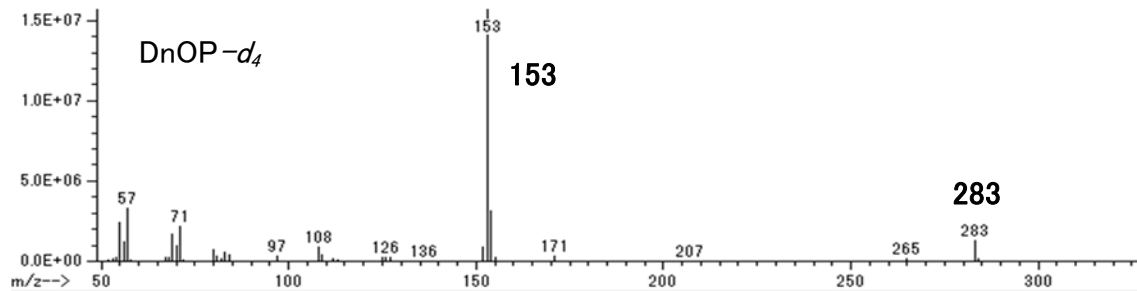
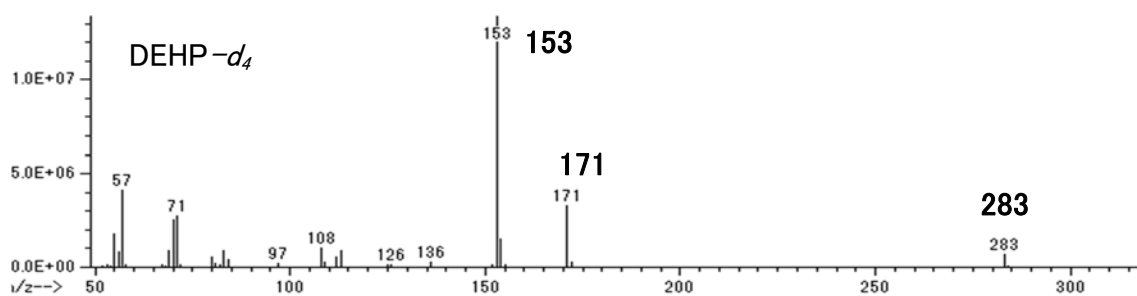
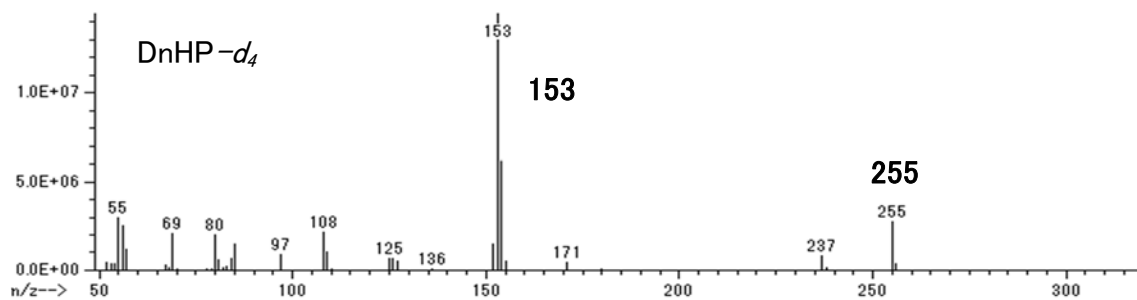
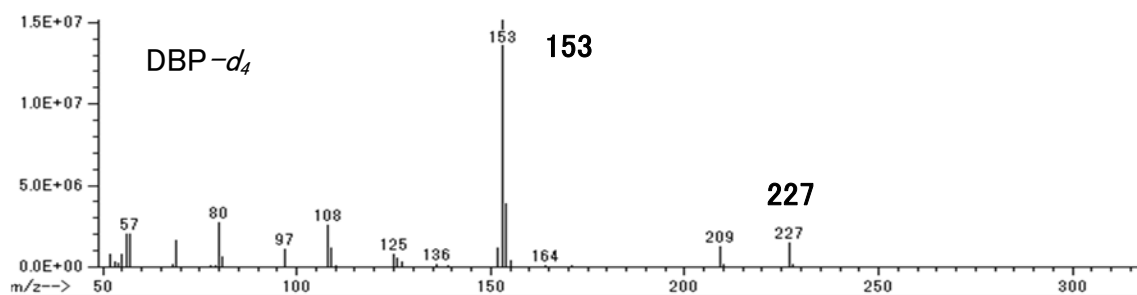
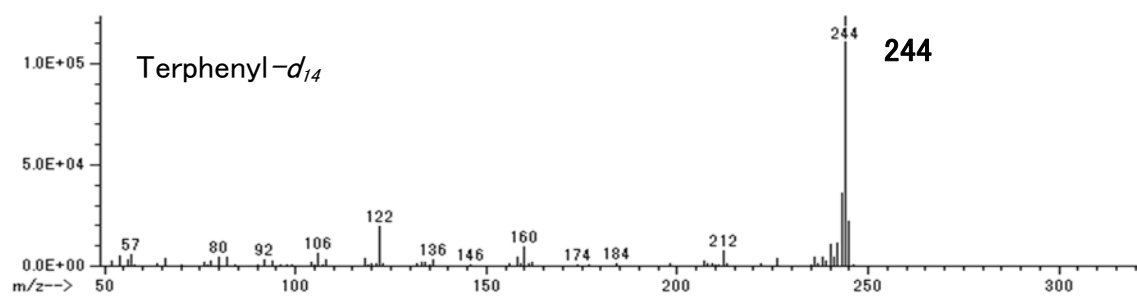


図8-2 各物質のGC/MSスペクトル(EI)

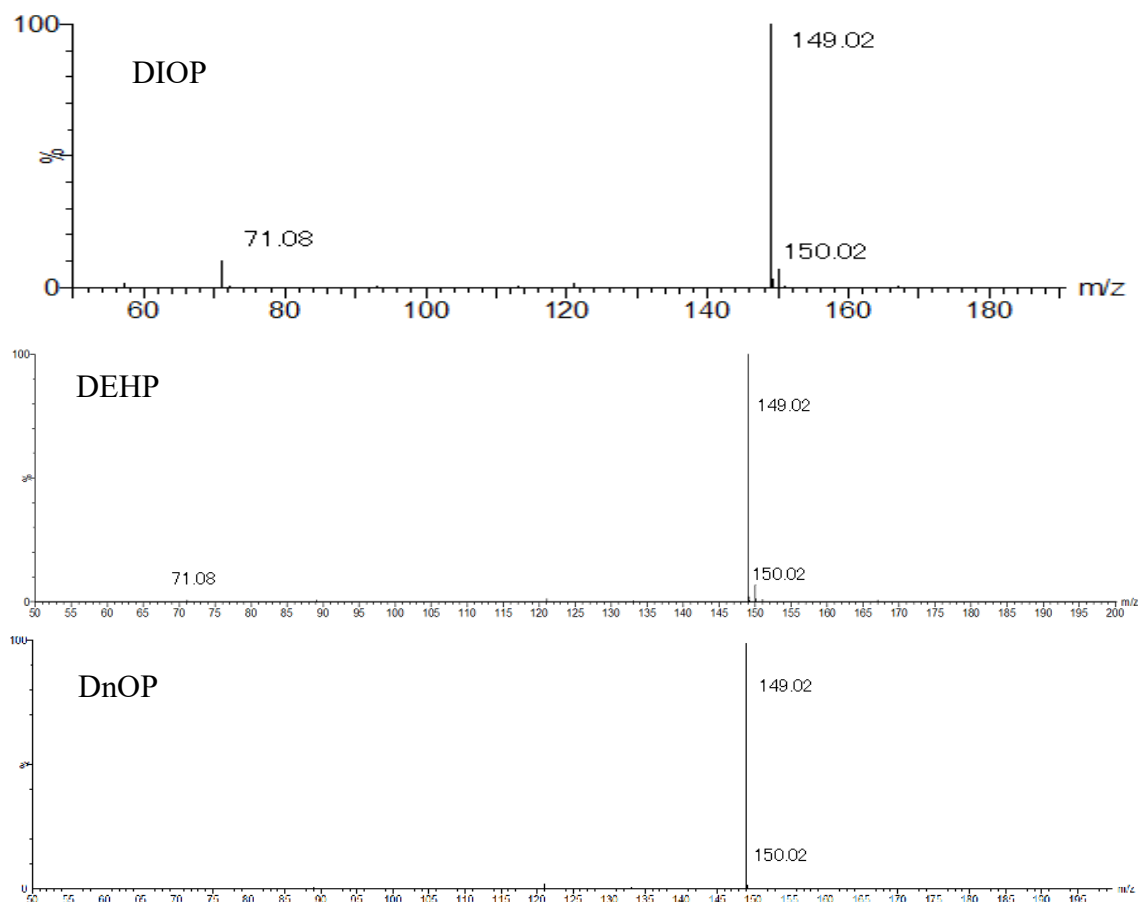


図9 DIOP、DEHP、DnOPのLC/Q-TOFMSスペクトル
(ESI、プレカーサーイオン m/z 391.32に対するプロダクトイオン)

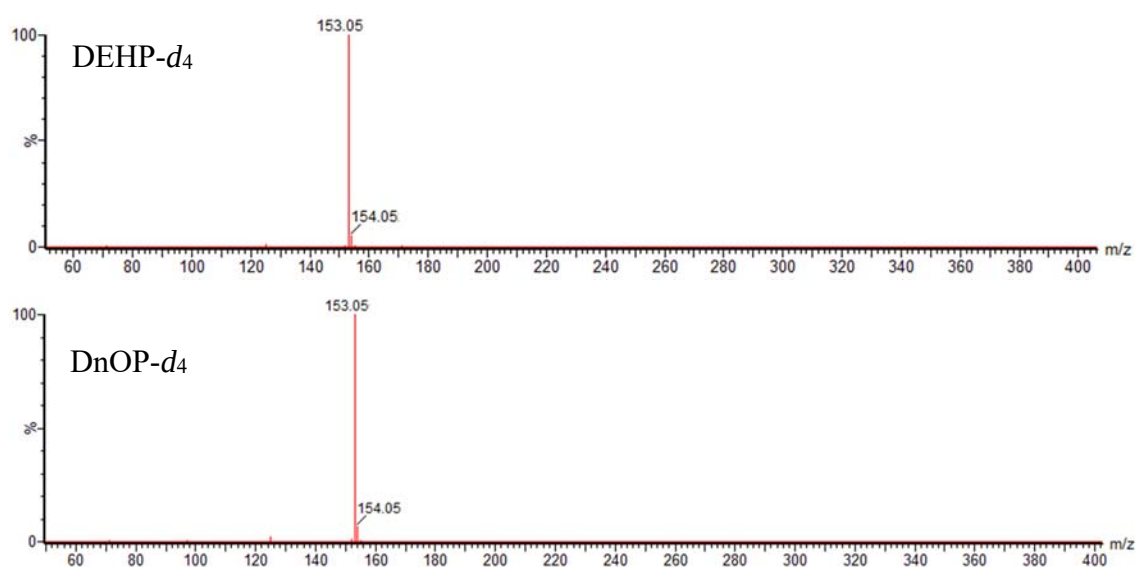


図10 DEHP- d_4 、DnOP- d_4 のLC/Q-TOFMSスペクトル
(ESI、プレカーサーイオン m/z 395.32に対するプロダクトイオン)

〔操作ブランク〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 11 に示す。DBP 0.011 $\mu\text{g/L}$ と DEHP 0.088 $\mu\text{g/L}$ と検出下限未満の DIOP が検出された。

このように、厳密な器具洗浄を行ったと思っていても、簡単に汚染することがあるので、各測定時に同時に操作ブランクを毎回測定することが望ましい。

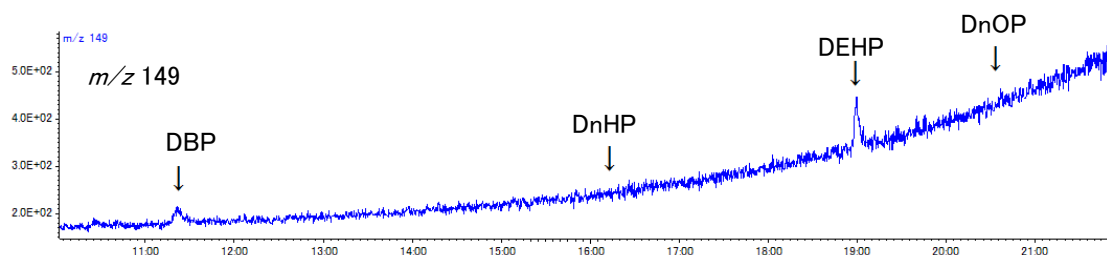


図 11-1 操作ブランクの GC/MS クロマトグラム

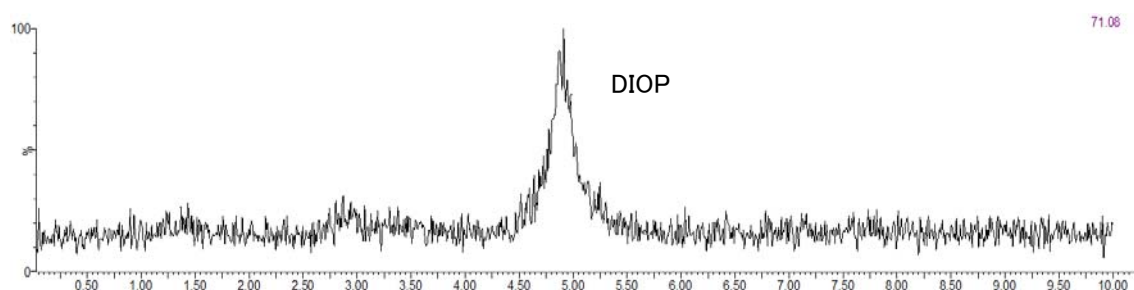


図 11-2 操作ブランク測定時の LC/Q-TOFMS クロマトグラム

〔添加回収試験結果〕

添加回収試験結果を表 10 に示す。河川水には多摩川の水質試料を、海水には川崎港の水質試料を用意し、それぞれ一度ヘキサンで抽出した水層を使用した。エステル炭素数が多くなるにつれ、サロゲート回収率（実質回収率）が低下する傾向にあった。

表10 添加回収試験結果

物質名	試料*1	試料量 (mL)	試験 数	添加量 (ng)	検出濃度 (μg/L)	回収率*2 (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
DBP	河川水	100	2	0	0.048	-	-	86
			5	12	0.11	90	7.6	84
	海水	100	2	0	0.020	-	-	85
			6	12	0.093	78	7.0	85
DnHP	河川水	100	2	0	<0.015	-	-	73
			5	40	0.32	81	6.3	81
	海水	100	2	0	<0.015	-	-	80
			6	40	0.34	84	9.1	81
DEHP	河川水	100	2	0	0.38	-	-	52
			5	200	1.2	61	10	59
	海水	100	2	0	0.090	-	-	67
			6	200	1.4	68	4.4	66
DnOP	河川水	100	2	0	<0.021	-	-	47
			5	60	0.38	63	8.6	53
	海水	100	2	0	<0.021	-	-	61
			6	60	0.40	67	4.8	57
DIOP*3	河川水	100	2	0	<0.19	-	-	-
			6	200	1.3	64	15	-
					1.9	95	5.8	73
	海水	100	2	0	<0.19	-	-	-
			5	200	1.5	76	5.2	-
					1.8	91	4.5	87

*1：各試料は、一度ヘキサン洗浄したものを使用した。

*2：相対検量線を用いた場合の回収率は、サロゲート補正後の値

*3：DIOPの添加回収結果は、上段が絶対検量線法、下段が相対検量線法の値

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 11 に示す。DBP については、試料調製時に汚染があったとみられ、調製濃度よりも濃くなっているが、1 時間後の値を基にすると、7 日間後の検出濃度も同レベルであった。DBP と DEHP の明所については、光に当たることで、容器からの溶出が加速されたと考えられるが、詳細は不明である。

表 11 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製濃度*1 (ng/mL)	検出濃度 (ng/mL) (残存率*2 (%))		
				1 時間後	7 日間後	
					暗所	明所
DBP	5	2	2.0	3.3 (160)	3.4 (170)	-
	7	2	2.0	2.7 (130)	3.3 (160)	5.7 (290)
	9	2	2.0	2.5 (120)	3.3 (170)	-
DnHP	5	2	3.0	3.0 (100)	2.0 (68)	-
	7	2	3.0	2.6 (88)	2.0 (68)	2.4 (80)
	9	2	3.0	3.2 (107)	2.1 (70)	-
DEHP	5	2	80	69 (86)	82 (100)	-
	7	2	80	63 (79)	90 (110)	131.0 (160)
	9	2	80	64 (80)	92 (120)	-
DnOP	5	2	10	9.5 (95)	7.0 (70)	-
	7	2	10	8.0 (80)	7.7 (77)	8.2 (82)
	9	2	10	8.4 (84)	7.6 (76)	-
DIOP (絶対検量 線法)	5	2	70	77 (110)	62 (89)	-
	7	2	70	54 (77)	74 (106)	73 (104)
	9	2	70	61 (87)	81 (116)	-
DIOP (相対検量 線法)	5	2	70	83 (118)	68 (97)	-
	7	2	70	80 (115)	76 (109)	64 (92)
	9	2	70	78 (112)	95 (136)	-

*1：測定時の濃度としての値

*2：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験の結果を表 12 に示す。河川水を事前にヘキサンで抽出した試料 100 mL に GC/MS 用は DBP 4 ng、DnHP 6 ng、DEHP 160 ng、DnOP 20 ng の混合のメタノール溶液、LC/Q-TOFMS 用は DIOP 140 ng のメタノール溶液を添加し、7 日

後にサロゲート内標準物質を添加して測定した。各試料の保存性試験の結果は良好であった。

なお粗抽出液については、雰囲気や器具からも汚染してくるため、ヘキサン抽出液や処理後の試験液での保存の検討を行ったが、長期保存に耐える方法を導き出すことができなかった。そのため、試料の前処理を始めたなら、機器分析まで行ってしまうこととした。

検量線用標準液についても、雰囲気や器具から汚染があるため、保存せずに、測定直前に、検量線用標準原液または混合標準液から希釈して調製することとした。

また、GC/MS 用標準原液も 1 年間の冷蔵保存したものを 10 ng/mL に希釈して測定を行った結果、1 mg/mL のものが 102～122%、1 µg/mL のものが 113～130% と徐々に汚染されることによる測定値の上昇がみられるため、DIOP 標準原液と共に、長期間の保存には適さないと考えられる。

表 12-1 DBP の保存性試験結果

試料名		調製濃度		検出濃度（残存率(%) ^{*1} ）
		試料濃度	試験液濃度	7 日間
		(µg/L)	(ng/mL)	(µg/L)
河川水 ^{*2}	試料	0.040	—	0.040 (99)
	粗抽出液	—	—	※

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：河川水は、事前にヘキサンで洗浄したものを使用した。

※：汚染源が多く、保存は不可。

表 12-2 DnHP の保存性試験結果

試料名		調製濃度		検出濃度（残存率(%) ^{*1} ）
		試料濃度	試験液濃度	7 日間
		(µg/L)	(ng/mL)	(µg/L)
河川水 ^{*2}	試料	0.060	—	0.060 (100)
	粗抽出液	—	—	※

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：河川水は、事前にヘキサンで洗浄したものを使用した。

※：汚染源が多く、保存は不可。

表 12-3 DEHP の保存性試験結果

試料名	調製濃度		検出濃度（残存率(%) ^{*1} ）
	試料濃度	試験液濃度	7 日間
	(μg/L)	(ng/mL)	(μg/L)
河川水 ^{*2} 試料	1.6	—	1.2 (77)
	粗抽出液	—	※

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：河川水は、事前にヘキサンで洗浄したものを使用した。

※：汚染源が多く、保存は不可。

表 12-4 DnOP の保存性試験結果

試料名	調製濃度		検出濃度（残存率(%) ^{*1} ）
	試料濃度	試験液濃度	7 日間
	(μg/L)	(ng/mL)	(μg/L)
河川水 ^{*2} 試料	0.20	—	0.17 (83)
	粗抽出液	—	※

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：河川水は、事前にヘキサンで洗浄したものを使用した。

※：汚染源が多く、保存は不可。

表 12-5 DIOP の保存性試験結果

試料名	調製濃度		検出濃度（残存率(%) ^{*1} ）
	試料濃度	試験液濃度	7 日間
	(μg/L)	(ng/mL)	(μg/L)
河川水 ^{*2} 試料	1.4	—	1.4 (100) ^{*3}
			1.7 (120) ^{*3}
粗抽出液	—	—	※

*1：残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

*2：河川水は、事前にヘキサンで洗浄したものを使用した。

*3：上段は絶対検量線法、下段は相対検量線法での定量結果

※：汚染源が多く、保存は不可。

〔従来の分析法にあるブランク低減の確認〕

フタル酸エステル類（特に DEHP）は、様々なものに使用されているため、室内環境中に非常に多く存在しており、室内に放置している器具等は汚染されて

いることがわかっている。そのため、従来の分析法^{1~3)}に記載のあるブランク低減法を中心に、確認と検討を行った。

従来の分析法^{1~3)}にある器具等の洗浄方法に従って洗浄等を行い、ブランクを低減したメスフラスコを用いて、新品のヘキサンで器壁を洗浄し、ブランクを測定した。また、開封後しばらく経過しているヘキサンについても測定を行った(図12)。DBP及びDEHPが観測された。また、開封後しばらく経過しているヘキサンは、DBP及びDEHPにかなり汚染されており、DINPが観測される領域にも小さいピークが観測された。

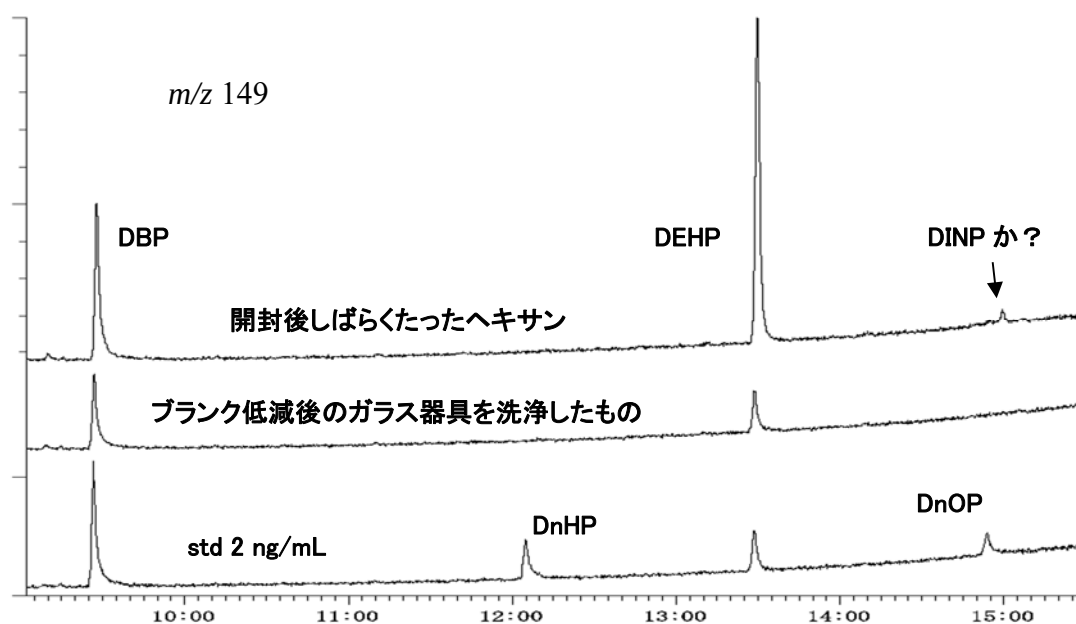


図12 SIMクロマトグラム

※従来の方法

- ・バイアル : ヘキサンで超音波洗浄後、105℃ 2時間加熱。使用前に新品のヘキサンで流す。セプタムは使用せず、アルミホイルで覆う。
- ・GCセプタム : 300℃ 2時間加熱したものを使用
- ・その他ガラス器具 : ヘキサン洗浄して使用

〔バイアルの洗浄方法の検討〕

新品バイアルを使用し、セプタムを使用せず、バイアルの洗浄方法の検討を行った。従来の方法では、加熱後に室温に戻す時に汚染されていると考え、洗浄のみで除去できるかどうかを検討した。

ヘキサンに3日以上浸け置き、その後アセトン、ヘキサンの順に洗浄を行い、軽くヘキサンを切ったものが、最もフタル酸エステル類の除去ができた。(図13)

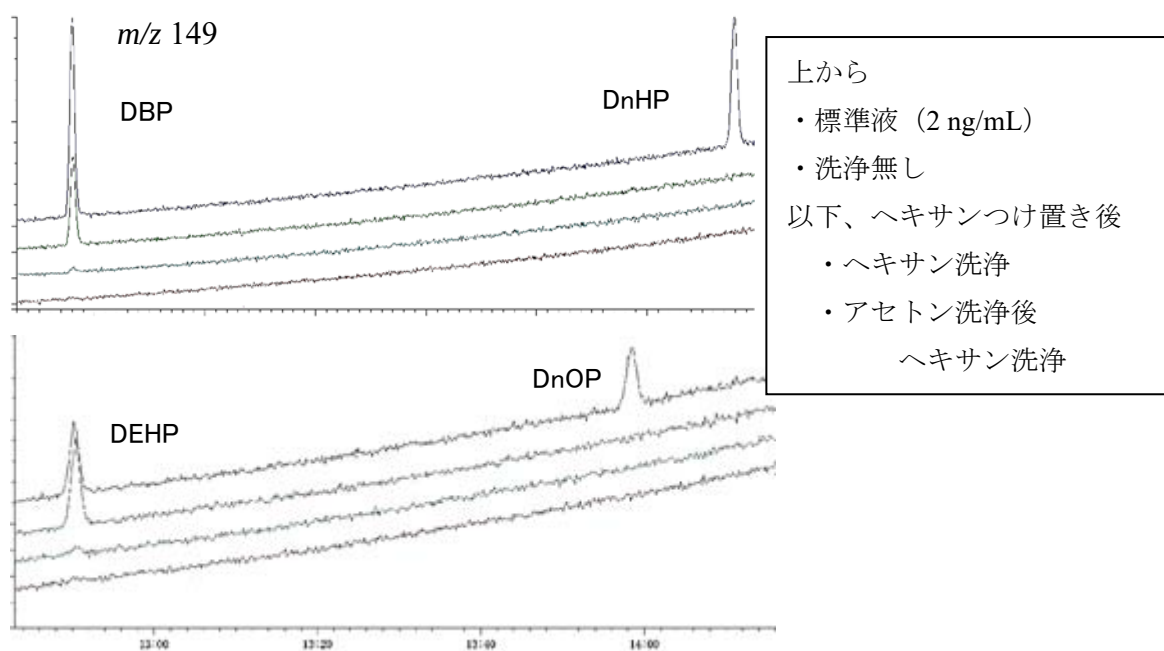


図13 洗浄によるSIMクロマトグラムの違い

〔バイアルセプタムからの汚染の確認〕

前項のように洗浄を行ったバイアルについて、セプタム付きのキャップを用いた場合と、セプタムの代わりにヘキサン洗浄したアルミホイルを用いた場合の比較を行った。アルミホイルは、測定までになるべく外気に触れないために使用する。

アルミホイルは実験用のものでは厚いものがあり、厚さによってはバイアルキャップを閉められないため、家庭用のアルミホイルを2 cm 角にしたものをかぶせたところに、セプタムを外したバイアルキャップをつけた。セプタムは、アセトンとヘキサンで洗浄したものを使用した。

アルミホイルのみのものはフタル酸エステル類が観測されなかったが、セプタムを使用したものは、わずかではあるが、DBP が観測された。(図 14 の下 2 つのクロマトグラム)

〔メスフラスコの洗浄の検討(1) 溶媒での洗浄検討〕

検討段階初期において、メスフラスコでの液液抽出を検討していたため、メスフラスコの洗浄方法を検討しているが、これはそのまま、スピッツ管等に応用できる。(〔メスフラスコの洗浄の検討(2) 酸での洗浄検討〕も同じ)

メスフラスコの洗浄は、少量のアセトン 2 回とヘキサン 2 回の順に洗浄を行い、軽くヘキサンをきった後に 2 mL のヘキサンを入れ、よく振ったものを測定した。汚染しやすい DEHP の完全な除去はできなかった (図 14)。なお、バイア

ルと違い、メスフラスコをヘキサンに浸けこむまたはメスフラスコ内をヘキサンで満たしておくことは、溶媒を大量に使用し、非現実的なので、検討は行っていない。

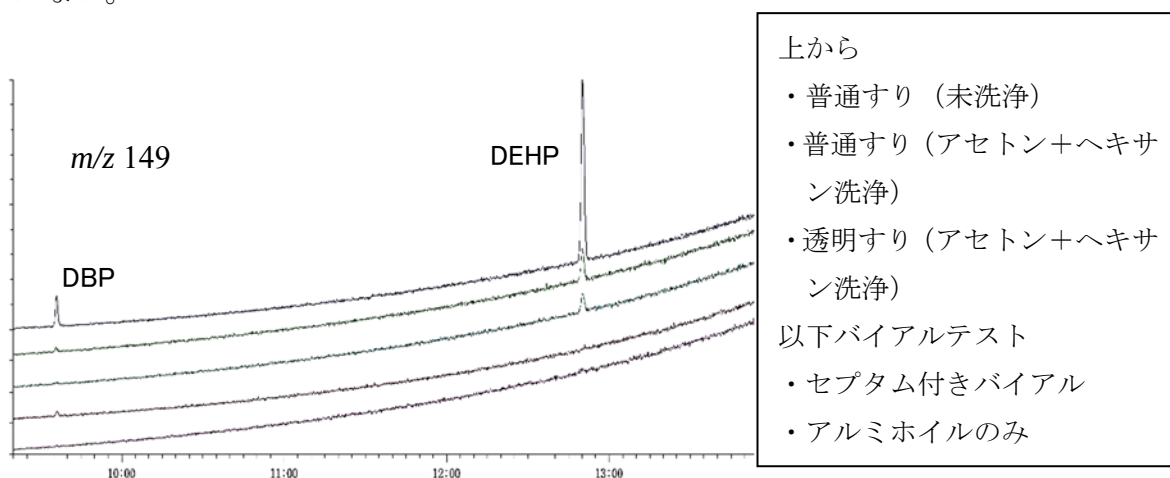


図14 メスフラスコの洗浄によるSIMクロマトグラムの違いとバイアルセプタムの影響

〔メスフラスコの洗浄の検討(2) 酸での洗浄検討〕

過去にフタル酸エステル類を分析する際に、濃硫酸にガラス器具を浸けこみ、吸着しているフタル酸エステル類を洗浄したという情報を得た。しかし、今日の状態を考えると、濃硫酸槽を使用することは非現実的なため、ICP測定に使用するガラス器具を洗浄するための硝酸槽を用いた洗浄を検討した（図15）。

メスフラスコは、透明すりと普通のすりのものを使用し、硝酸(1+6) 槽に3日以上浸けこみ、Milli-Q水でよく流したのち、乾燥させずに1 mLのアセトンで2回、1 mLのヘキサンで2回洗浄し、軽くヘキサンをきった後に2 mLのヘキサンを入れ、よく振ったのちのそのヘキサンを測定した。

普通すり及び透明すりのメスフラスコのどちらとも、使用したヘキサンと同レベルのDEHPが観測された程度であるため、この洗浄方法でガラス器具を洗浄することにした。従来の測定法では透明すりの使用に限定しているものも見られたが、よく酸洗浄することで、普通のすりのメスフラスコも使用できる。

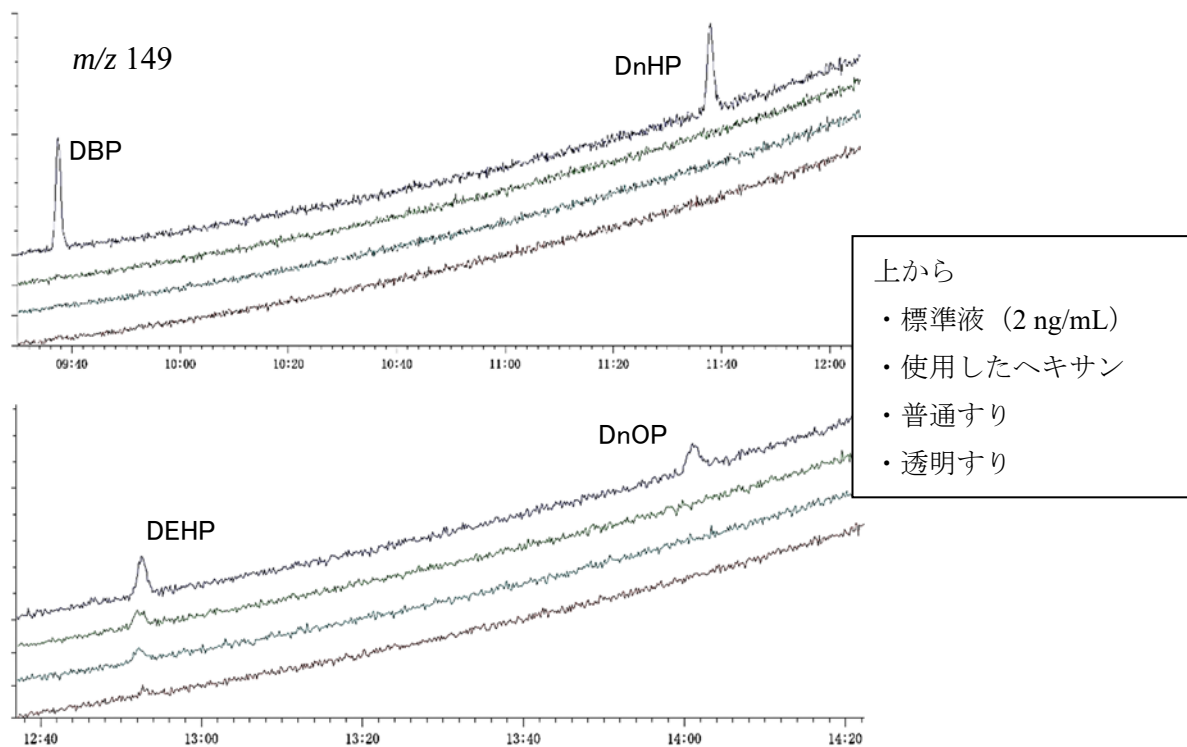


図15 メスフラスコの酸洗浄によるSIMクロマトグラム

〔手袋からの汚染〕

既存の分析法で指定されているニトリル手袋と素手からの汚染の確認を行った。素手の場合と、ニトリル手袋を装着した場合の2種類について、人差し指の第一関節より先に、ヘキサン2 mLを流して試料とした。

素手では今回のGC/MS分析対象の4物質について、全て検出された。その中でも特にDEHPは多量に観測された（図16）。

ニトリル手袋についても、素手よりは少ないものの、DBPとDEHPが観測された（図17）。

どちらの場合も、一般の固形石鹸で手洗いを行ったところ、洗浄前に観測された物質は軽減されたが、なくなることは無かった。ニトリル手袋では、手袋から観測されないフタル酸エステル類が増加していた。

これらのことから、ニトリル手袋を使用する場合でも、不用意に器具のすり部分に触れる等を行うことにより、操作ブランクが大きくなるリスクはなくならないため、細心の注意が必要である。

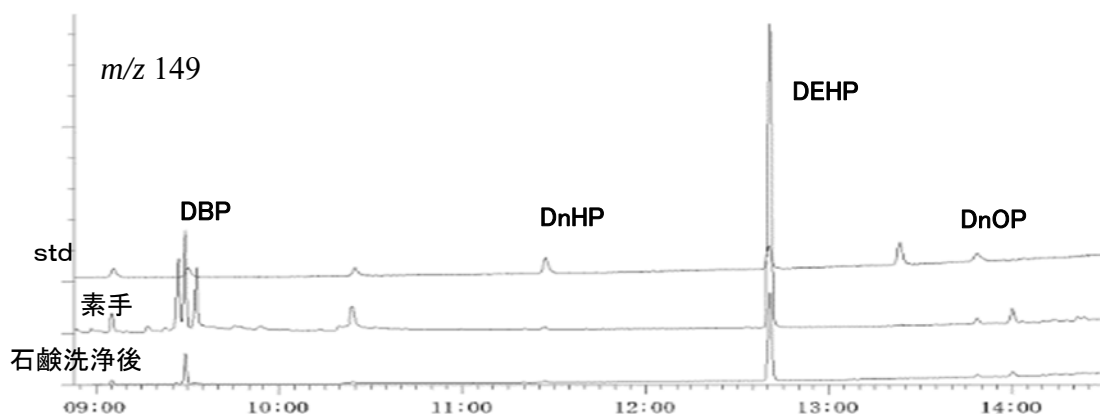


図16 素手を石鹼で洗浄した場合のSIMクロマトグラム

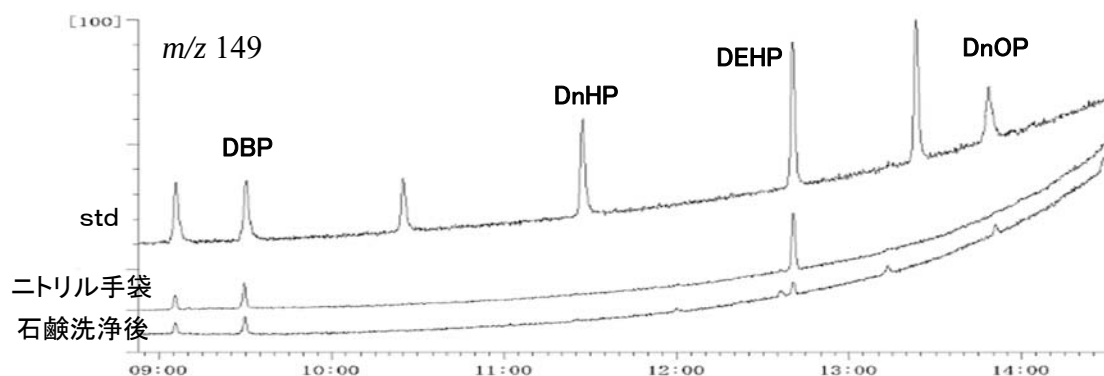


図17 ニトリル手袋をした手を石鹼で洗浄した場合のSIMクロマトグラム

〔その他の器具の洗浄方法〕

・GC/MSライナと注入口セプタム

どちらも過去の分析法では、加熱してフタル酸エステル類の低減を行っているが、今回の各測定時に同様の処理を行ったもので行っていないものについて、有意な差は確認できなかった。

そのため、GC/MSライナはバイアルに準じた洗浄を行った。

注入口セプタムについては、Agilent製の高性能セプタムは、今回の分析の対象物質が多く出る傾向にあったため、SPELCO製のサーモグリーンLB-2セプタムの表面を軽くヘキサン洗浄して使用した。

これらのことを行っても、交換直後はフタル酸エステル類が観測されることがあるが、何度か溶媒を測定しているうちに、観測されなくなった。このように、GCの注入口は常に加熱されているため、フタル酸エステル類の低減に加熱の効果があることがわかるが、事前に加熱処理を行っても、冷却時等に雰囲気から汚染される場合も多いと考えられ、今回の検討では、事前の加熱処理は行わないこ

とにした。

・ パストールピペットとマイクロシリンジ

使用直前にアセトンとヘキサンで洗浄したものを使用していた。特にこれが原因と考えられるピークの観測はなかった。

・ スピッツ管等、通常再使用が前提の器具で、硝酸槽に浸けおきができるもの
メスフラスコに準じて、洗浄を行うことが望ましい。

※なおこれらの器具については、使用直前に洗浄すること。

これまで記載してきたように、雰囲気中からの汚染が確認されているため、
洗浄後時間が経つにつれて、器具についても汚染が進行していく。

〔試料採取容器の検討〕

これまで記載してきたように、雰囲気中など汚染源がどこにでもあり、器具等も汚染されているため、それらからも溶出してくる。

試料採取によく使用されるデュラン瓶については、新品、再使用品問わず、**§ 1 分析法 (3) 分析法【使用器具の洗浄】**のメスフラスコに準じた洗浄や、酸を入れたままでの超音波洗浄など、いろいろ試みたが、洗浄後に蒸留水を満たし、ヘキサンで洗浄したアルミホイルを挟んで、パッキンのついている蓋をして保存すると、短期間でも必ずDEHPが観測された。

また、抽出で使用するメスフラスコも、抽出する時間程度ではほとんど影響が無いが、蒸留水を入れて4日間冷蔵保管したのち、その蒸留水をヘキサンで抽出して測定すると、新品、再使用品問わず、DEHPの汚染が確認された（図18）。

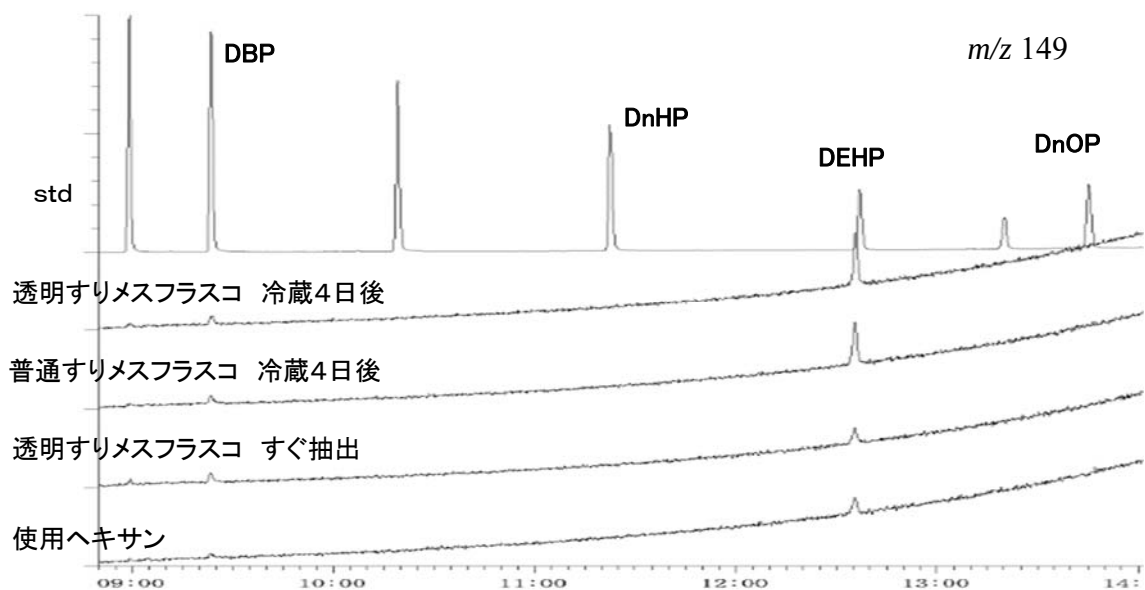


図18 メスフラスコで保存した場合のSIMクロマトグラム

このように、通常のガラス容器では数日間の保存によって、汚染が生じるため、フタル酸イソノニル等の分析法⁴⁾を参考に、PFAボトルを使用したところ、7日程度の冷暗所保存ができることがわかった。（〔保存性試験〕の項を参照）

バイアルでヘキサンを保存する実験では、冷蔵4日程度では、バイアルからの溶出はみられなかった。しかし、アルミホイルのみのキャップでは冷蔵条件でもヘキサン量の減少がみられたため、雰囲気からの汚染の恐れがあるため、長期の保存はできないと考えられる（図19）。

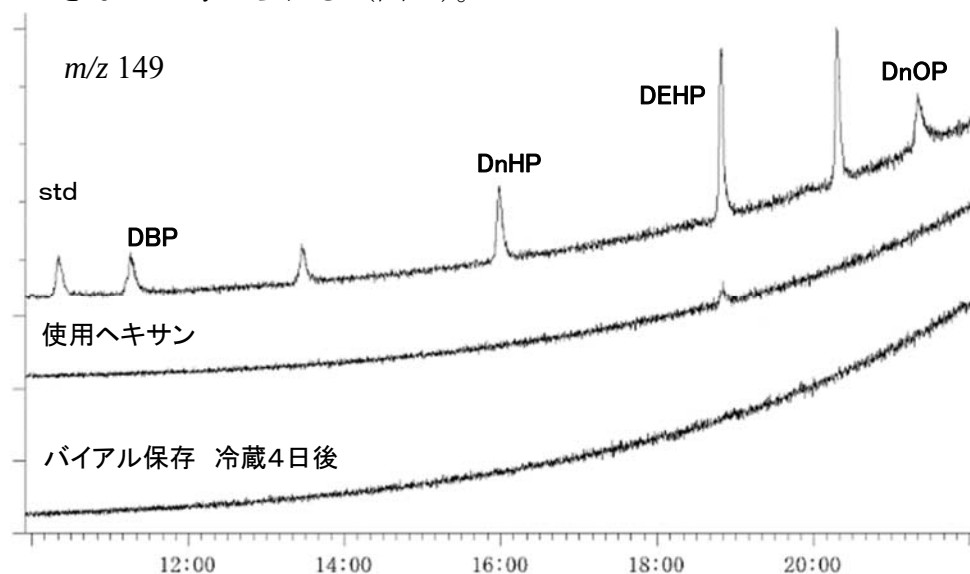


図19 バイアルでヘキサンを保存した場合のSIMクロマトグラム

〔GC/MSによるDIOPの分析〕

GC/MS 分析では、フタル酸エステル類は、強度が飛びぬけて高い $m/z149$ で定量を行うが、DIOP の保持時間の遅い部分と DINP の早い部分が重なるため、微量部分では定量ができない。

フェニルメチルシリコン系カラム（1MS, 5MS, 17MS）での分離はできず（図20）、WAX 系カラムでは使用温度が低いため、溶出しなかった。

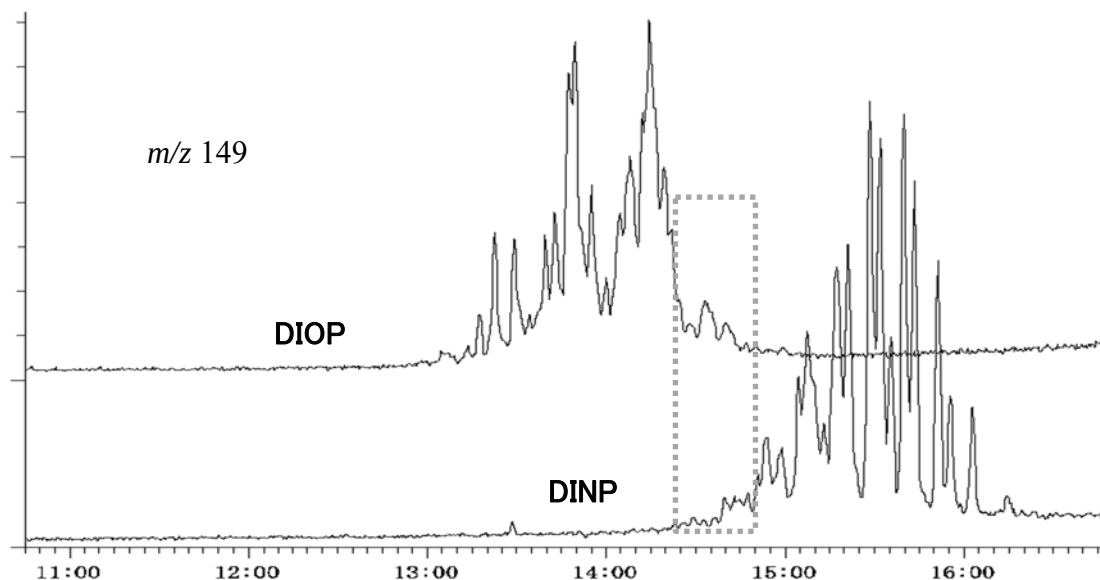


図20-1 DIOPとDINPのGC/MS-SIMクロマトグラム (1 $\mu\text{g/mL}$ 、カラム : InertCap 5MS/Sil)

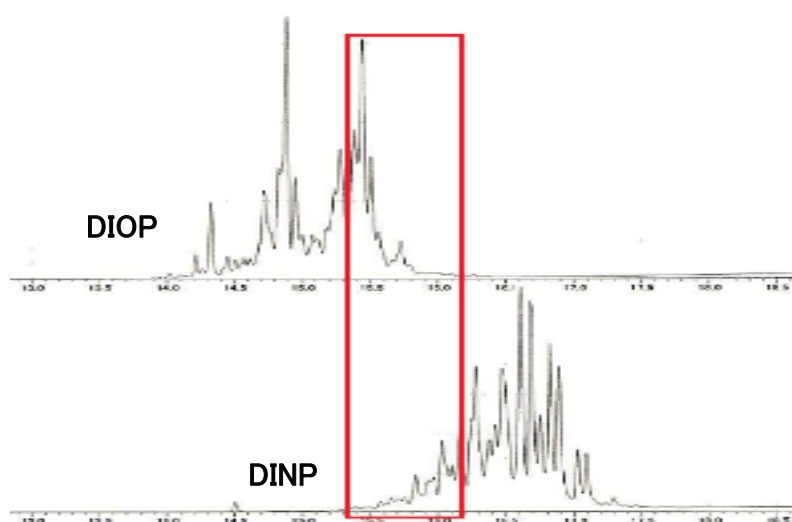


図 20-2 DIOP と DINP の GC/MS-SIM クロマトグラム (1 $\mu\text{g/mL}$ 、カラム : 17MS 系)

試しに検量線を作成してみたところ、かろうじて50 ng/mLから引けるが、100~200 ng/mLからが現実的であろう (図21)。しかし、検量線濃度と調査要求感度から考え、試料量が単純計算で10 L以上になることから、GC/MSでの分析は現実的ではないと考えた。

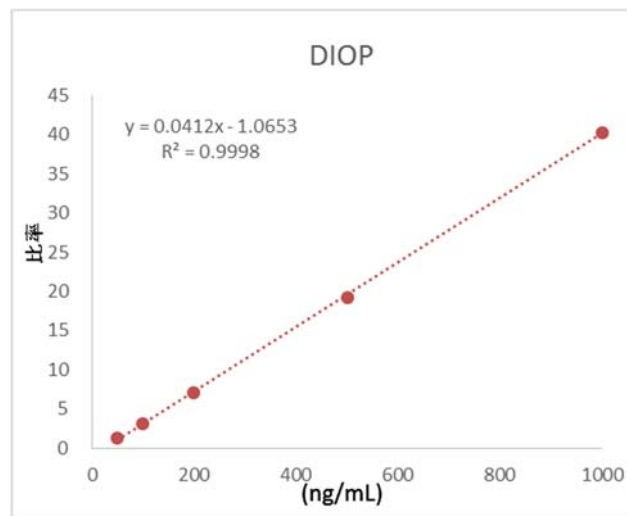


図21 GC/MSによるDIOPの検量線

表11 GC/MSによるDIOPの検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	面積値		面積比
	DIOP	BaA- <i>d</i> ₁₂	
50	71970	59616	1.207
100	165219	54146	3.051
200	334104	46980	7.112
500	942155	49051	19.208
1000	2433682	60442	40.265

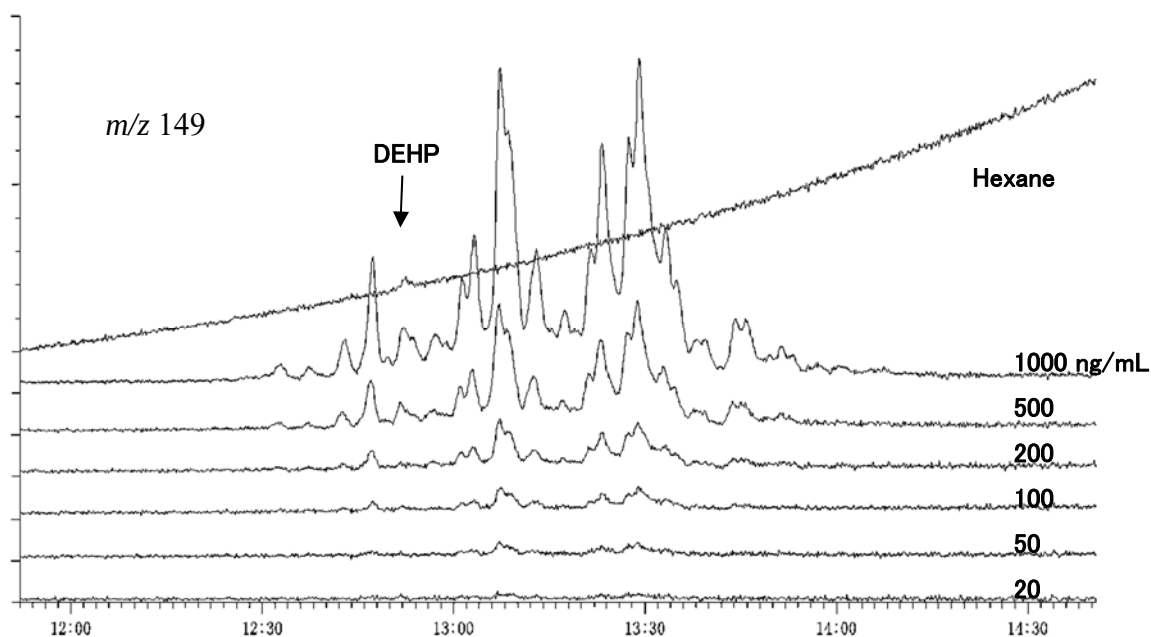


図22 SIM 差分クロマトグラム (DIOP : 20~1000 ng/mL)
(ヘキサン以外は、ヘキサンのクロマトグラムを引いた差分)

また、国内メーカーのDIOP標準試薬は混合物であるのに対し、DIOP- d_4 は単一物質であった(図23)。このように製造過程が違う場合に、DIOPの組成が常に同一とはいえない可能性がある。そのため、比較的ピークを一つにまとめることができるLC/MSでの検討を行うことにした。

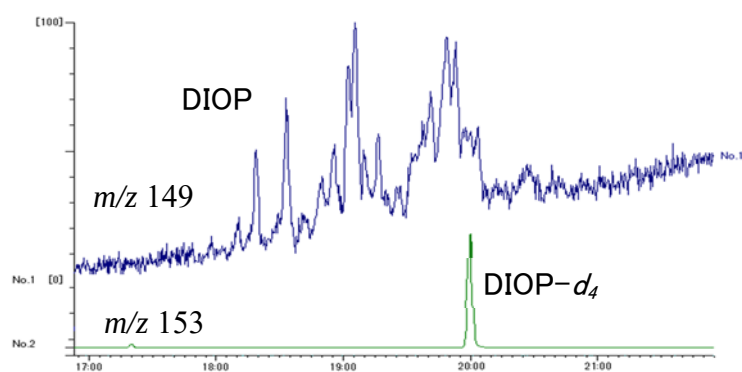


図 23 DIOP と DIOP- d_4 の GC/MS クロマトグラム

〔LC/Q-TOFMS 用試料の溶媒の検討〕

LC/MS では、ヘキサン溶媒の試料を注入すると、ヘキサンの影響で、LC の中から対象物質（主に DEHP）が溶出してくる。メタノール溶媒では溶出してこなかったため、ヘキサンからメタノールへの転溶を検討した。

スピッツ管にヘキサン溶媒の試料を取り、窒素吹付で 20 分の 1 程度に濃縮する。そこへ元の溶液量になるようにメタノールを加えて測定した。

窒素吹付を行う先端にパスツールピペットを用いて、その手前に活性炭を使用したものと使用しないものでブランク試験を行った。その結果、活性炭不使用の試料で、若干のピークらしき盛り上がりが見測されたが、DIOP の観測は、IDL 未満といえるレベルであった（図 24）。同じ試料を GC/MS で測定したところ、DEHP や DnOP の増加も観測されなかった（図 25）。

窒素の配管の汚染の度合いが、分析機関により様々である可能性があるため、活性炭を詰めたガラスチューブを 150℃ で窒素を通気しながら焼きだしを行い、そのまま冷却したものに、同じ方向に窒素が流れるように細いガラス管（パスツールピペット等）を接続し、濃縮を行うことにした。

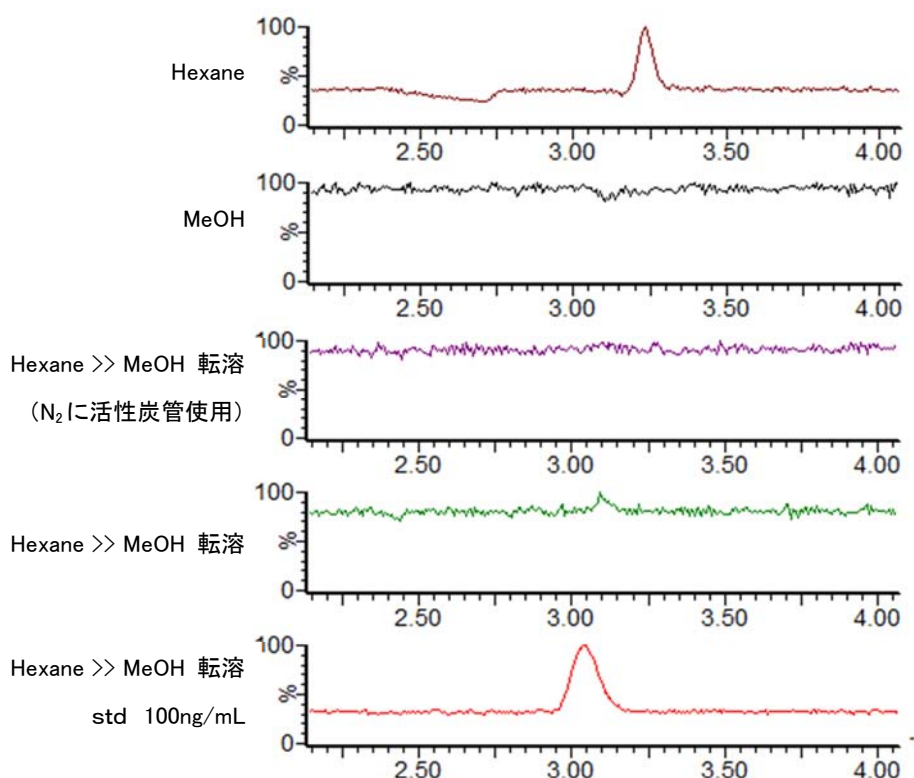


図 24 ヘキサンからメタノールへの転溶

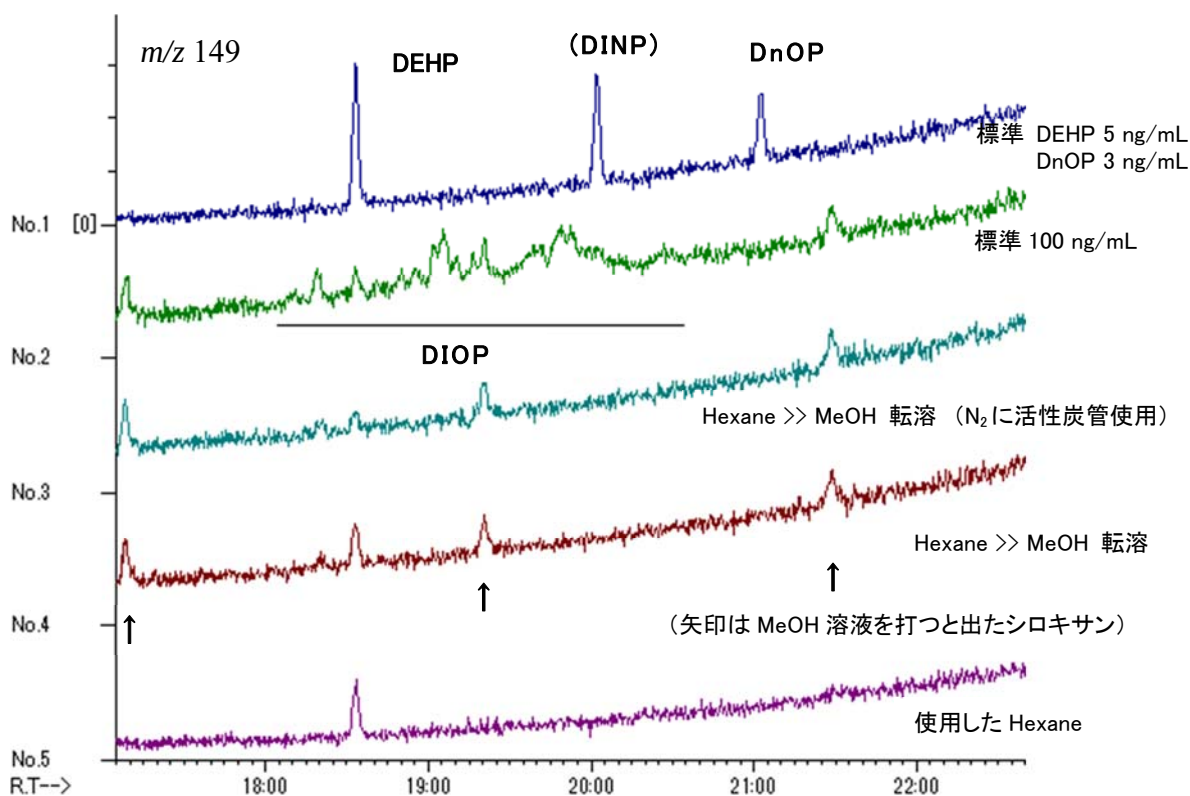


図 25 ヘキサンからメタノールへの転溶 (GC/MS)

〔測定イオンについて〕

DIOP は様々な分岐鎖が異なる異性体の混合物で、異性体の種類によってイオン化の度合いが異なっている。今回、標準液に使用した DIOP では機器の違いや条件によって、主要な 2 つのイオン (m/z 391.32 > 149.02 と m/z 391.32 > 71.08) の比が 1 : 1 から 10 : 1 の間で変化していた。最終的に採用した機器で最適化した条件では、この 2 つのイオンの比が 10 : 1 であり、装置感度としては m/z 391.32 > 149.02 の方がよかった。しかし、 m/z 391.32 > 149.02 を定量用イオンとして選択すると、DEHP の感度が DIOP の 10 倍近くあり、DIOP の測定であるのにもかかわらず、環境中に最も多く存在すると考えられる DEHP を、強度が 10 分の 1 の DIOP の検量線で定量することになる (DEHP を 10 倍の濃度評価をしてしまう)。これらを考慮し、ピーク強度は弱い、 m/z 391.32 > 149.02 よりも DEHP と DIOP の強度差があまりない m/z 391.32 > 71.08 を定量用イオンとして採用した (図 26)。

DIOP 標準液のクロマトグラムを見ると、 m/z 391.32 > 71.08 ではベースラインが下がるので、 m/z 391.32 > 149.02 でも m/z 391.32 > 71.08 でも検量線最低濃度は

10 ng/mL 程度から作成できるため、どちらのイオンを用いても定量下限には影響がないと考えられた。

各 C8 フタル酸ジエステル類のクロマトグラムを図 25 に示す。

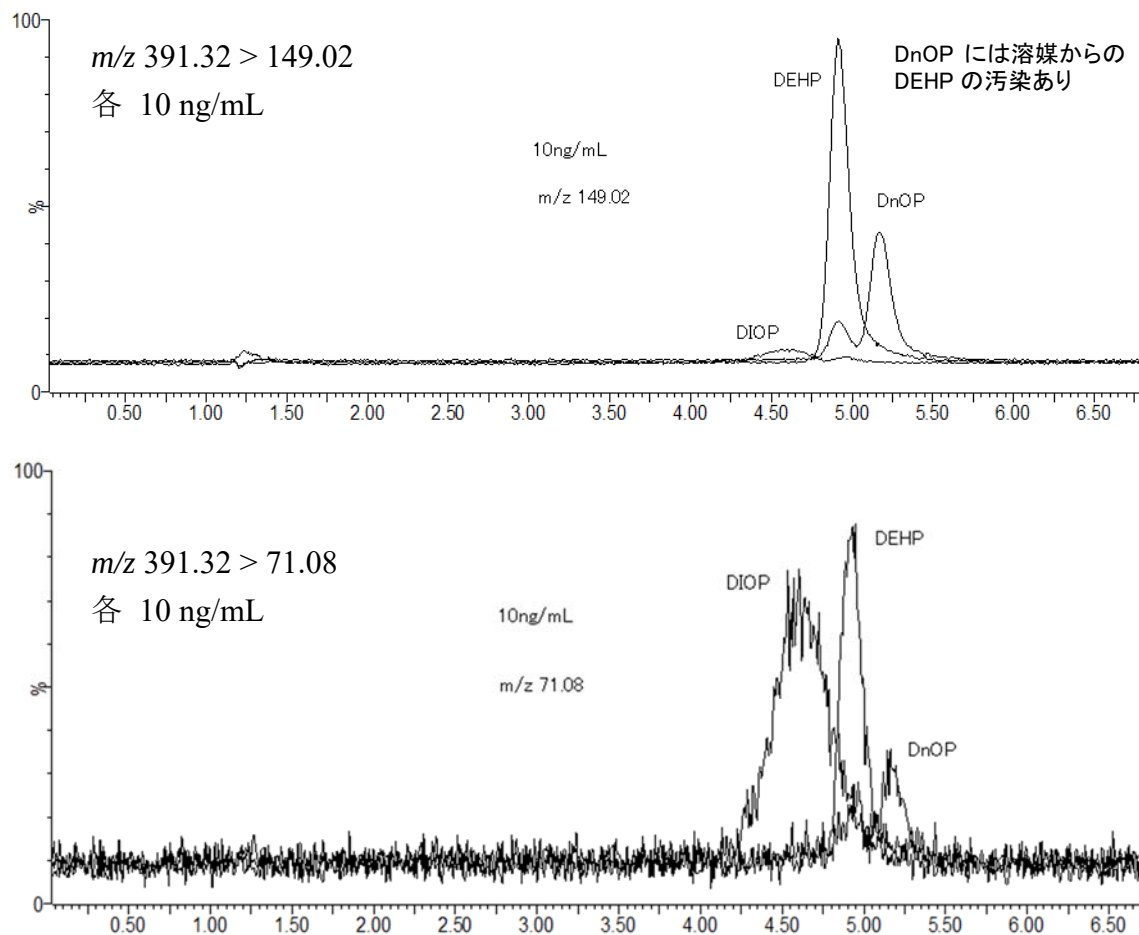


図26 C8フタル酸ジエステル類のイオン化の違い (LC/Q-TOFMS)

〔環境試料の分析例〕

本分析法により川崎市内の環境試料の分析を行った。河川水（多摩川）のクロマトグラムを図 27 に示す。DBP が 0.052 $\mu\text{g/L}$ 、DEHP が 1.3 $\mu\text{g/L}$ 、DIOP（C8 エステルの合算）が 0.96 $\mu\text{g/L}$ 検出された（図 27）。なお、この同一の試料での分析結果で、DIOP の方が DEHP より低濃度となったのは、DEHP は DEHP 標準で作成した検量線で測定し、DIOP は DIOP 標準（異性体混合物）の検量線で測定しているため、実試料では異性体のバランスが一定でなく、さらに、図 26 での DIOP と DEHP の例にもあるように、各異性体で感度の差があることが原因と考えられる。

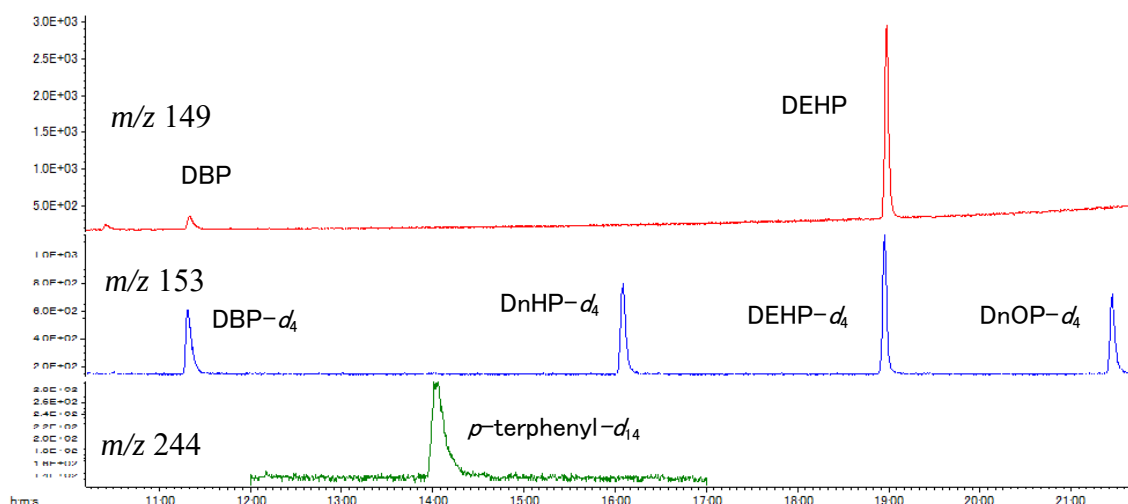


図 27-1 環境試料のクロマトグラム (GC/MS)

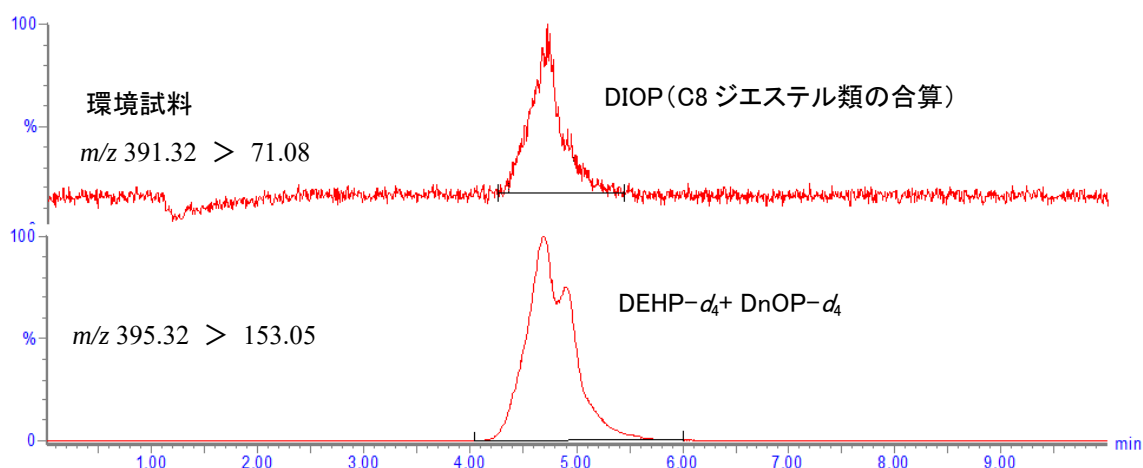


図 27-2 環境試料のクロマトグラム (LC/Q-TOFMS)

【評価】

本分析法における MDL は、DBP 0.0088 $\mu\text{g/L}$ 、DnHP 0.015 $\mu\text{g/L}$ 、DEHP 0.065 $\mu\text{g/L}$ 、DnOP 0.021 $\mu\text{g/L}$ 、DIOP 0.019 $\mu\text{g/L}$ 、MQL は、DBP 0.023 $\mu\text{g/L}$ 、DnHP 0.039 $\mu\text{g/L}$ 、DEHP 0.16 $\mu\text{g/L}$ 、DnOP 0.055 $\mu\text{g/L}$ 、DIOP 0.48 $\mu\text{g/L}$ である。検量線は、DBP 0.50～100 ng/mL、DnHP 1.0～200 ng/mL、DEHP 2.5～500 ng/mL、DnOP 1.5～300 ng/mL、DIOP 10～1000 ng/mL の範囲で直線性が確認された。本分析法により、川崎市内の河川水を測定したところ、河川からは DBP が 0.052 $\mu\text{g/L}$ 、DEHP が 1.3 $\mu\text{g/L}$ 、DIOP (C8 エステルの合算) が 0.96 $\mu\text{g/L}$ 検出された。

本分析対象物質（特に DBP と DEHP）は非常に汚染しやすく、ガラス器具や測定機器、更には雰囲気からも汚染される。そのため、試料採取後に分析を開始するために容器を開けたら、最終の機器分析まで行い、途中で保存をしない。

ない。また、採取容器は対象物質を吸着するので、本分析法に記載してある条件以上に抽出するための攪拌が必要な場合がある。

これらのことに注意することにより、本分析法で示した MDL レベルの環境測定が行える。

【参考文献】

- 1) 環境省、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル、IV-1-8 (1998)
- 2) 環境省、平成 23 年度化学物質分析法開発調査報告書（フタル酸ノルマルーブチル=ベンジル、フタル酸ビス（2-エチルヘキシル））、岡山県環境保健センター、(2012)
- 3) 環境省、平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書（フタル酸ジブチル、フタル酸イソブチル、フタル酸ジヘプチル、フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）、フタル酸ジオクチル、フタル酸ジイソノニル）、川崎市公害研究所、(1995)
- 4) 環境省、令和元年度化学物質分析法開発調査報告書（フタル酸ジノニル、ベンゼン-1,2-ジカルボン酸ジイソデシル、ジウンデカン-1-イル=フタラート）、神奈川県環境科学センター、(2020)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 川崎市環境局環境総合研究所環境リスク調査課

所属先住所 : 〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-13

川崎生命科学・環境研究センター 3 階

TEL : 044-276-8649、FAX : 044-288-3156

担当者名 : 江原 均

E-mail : 30sokan@city.kawasaki.jp

Dibutan-1-yl phthalate (DBP),
Dihexan-1-yl phthalate (DnHP),
Di(*n*-octyl) phthalate (DnOP),
Bis(2-ethylhexan-1-yl) phthalate (DEHP),
Diisooctyl phthalate (DIOP)

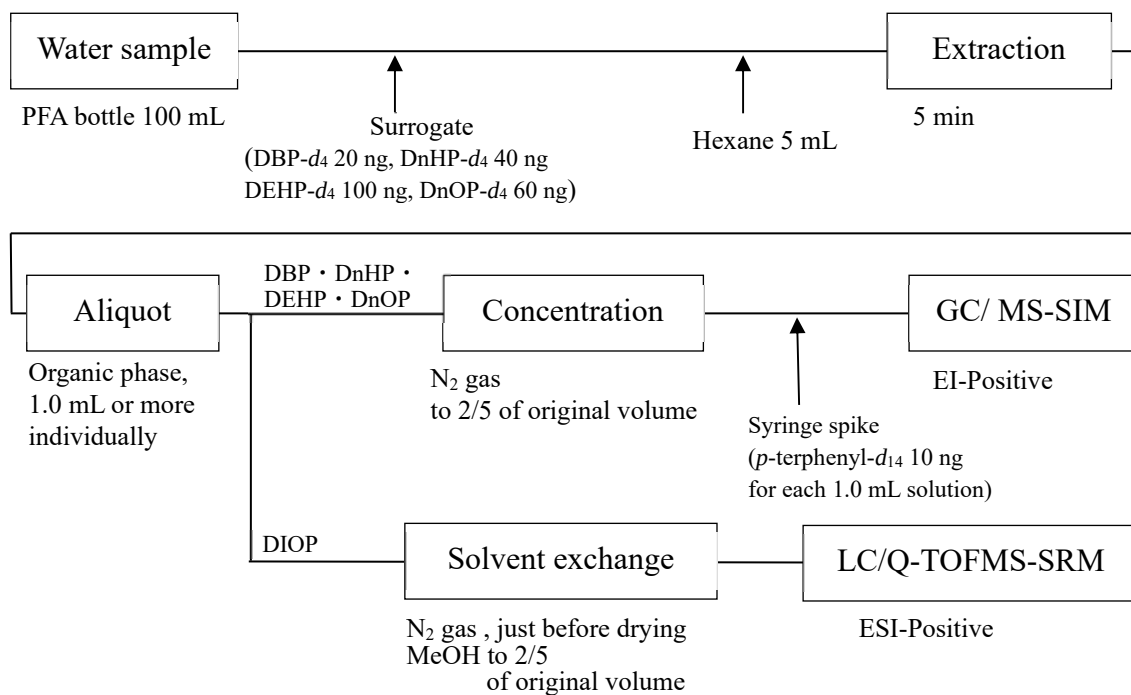
This method has been developed for the determination of five phthalic esters in water samples by gas-chromatography/mass spectrometry with EI (GC/MS-EI) and liquid-chromatography/Q-TOF mass spectrometry with selected reaction monitoring (LC/Q-TOFMS-SRM).

A sample is taken in a PFA 100 mL bottle. Then, the sample is added with mixture of DBP-*d*₄ (20 ng), DnHP-*d*₄ (40 ng), DEHP-*d*₄ (100 ng) and DnOP-*d*₄ (60 ng) as surrogate standards, and extracted with 5.0 mL of hexane. Then, 1.0 mL or more of organic phase is individually taken into two spitz tubes, which is one for GC/MS analysis and another for LC/Q-TOFMS analysis.

For GC/MS analysis (DBP, DnHP, DEHP and DnOP analysis), the separated extract is concentrated by spraying nitrogen until a volume of two-fifths of the original volume. This concentrated solution is added with 10 ng of *p*-terphenyl-*d*₁₄ for each 1.0 mL concentrated solution as syringe spike. This solution is analyzed by GC/MS-SIM (EI-positive).

For LC/Q-TOFMS analysis (DIOP analysis), the separated extract is concentrated by spraying nitrogen until just before drying, and added with MeOH until a volume of two-fifths of the original collected volume, and the mixture is stirred well. This solution is analyzed by LC/Q-TOFMS-SRM (ESI-positive). If the results of recovery test were low ratio, DIOP is quantitated by the relative calibration curve method using DEHP-*d*₄ and DnOP-*d*₄ as the surrogate standards.

The instrument detection limit (IDL) are 0.13 pg (DBP), 0.14 pg (DnHP), 0.39 pg (DEHP) 0.83 pg (DnOP) and 31 pg (DIOP). The method detection limit (MDL) are 0.0088 µg/L (DBP), 0.015 µg/L (DnHP), 0.065 µg/L (DEHP) 0.021 µg/L (DnOP) and 0.19 µg/L (DIOP). The method quantification limit (MQL) are 0.023 µg/L (DBP), 0.039 µg/L (DnHP), 0.17 µg/L (DEHP) 0.055 µg/L (DnOP) and 0.48 µg/L (DIOP). The average of recoveries (*n* = 5) from 12 ng of DBP added to water samples were 90% (CV = 7.6%), 40 ng of DnHP added to water samples were 81% (CV = 6.3%), 200 ng of DEHP added to water samples were 61% (CV = 10%), 60 ng of DnOP added to water samples were 63% (CV = 8.6%), 200 ng of DIOP added to water samples were 64% (CV = 15%). By the developed method, DBP were detected in river water at 0.052 µg/L, DEHP were detected in river water at 1.3 µg/L and DIOP were detected in river water at 0.96 µg/L, respectively.



物質名	分析法フローチャート	備 考
ジブタン-1- イル=フタラ ート ジヘキサン- 1-イル=フタ ラート フタル酸ジ- n-オクチル ビス(2-エチ ルヘキサン- 1-イル)=フ タラート ジイソオク チル=フタラ ート	【水質】 水質試料 PFA 容器 100 mL サロゲート内標準添加 (DBP-<i>d</i>₄ 20 ng DnHP-<i>d</i>₄ 40 ng DEHP-<i>d</i>₄ 100 ng DnOP-<i>d</i>₄ 60 ng) ヘキサン 5 mL 抽出 5 min 振とう 分取 GC/MS 用、LC/MS 用 ヘキサン層 各 1.0 mL 以上 DBP・DnHP・ DEHP・DnOP 濃縮 N₂ 気流下 5 分の 2 に濃縮 シリジスパイク添加 (<i>p</i>-テルフェニル-<i>d</i>₁₄ 濃縮液 1.0 mL につき 10 ng) GC/MS EI-positive DIOP (C8 エステル合算) 転溶 N₂ 気流下 乾固直前まで濃縮後 MeOH で、分取量の 5 分 の 2 の容量にする。 LC/Q-TOFMS ESI-positive	分析原理： GC/MS-EI LC/MS/MS-SRM 検出下限値： 【水質】 (μg/L) DBP : 0.0088 DnHP : 0.015 DEHP : 0.065 DnOP : 0.021 DIOP : 0.19 分析条件 1： 機器 GC : Agilent 7890B MS : 日本電子 Q1500 カラム InertCap 1MS 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm 分析条件 2： 機器 LC : Waters Acquity UPLC MS : Waters Xevo G2-XS QTof カラム XBridge C8 Column 2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm

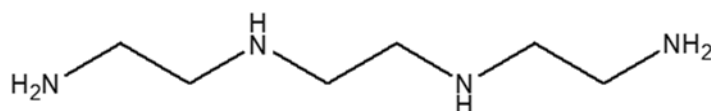
トリエチレンテトラミン

Triethylenetetramine

IUPAC 名：N,N'-bis(2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine

別名：TETA、3,6-ジアザオクタン-1,8-ジイルジアミン、N,N'-ビス(2-アミノエチル)-1,2-エタンジアミン

【対象物質の構造】



CAS 番号：112-24-3

分子式：C₆H₁₈N₄

【物理化学的性状】^{1), 2)}

対象物質名	トリエチレンテトラミン(TETA)
分子量（平均分子量）	146.23
分子量（モノアイソトピック質量）	146.15322
融点	12°C ¹⁾ 、-35°C ²⁾
沸点	266~67°C ¹⁾ 、277°C ²⁾
密度	1.4971 g/cm ³ (20°C) ¹⁾ 、0.98 g/cm ³ ²⁾
蒸気圧	9.8×10 ⁻³ mmHg (=1.3 Pa) (20°C)
溶解性	混和
log P _{ow}	-2.56 ¹⁾ 、-1.4/-1.66 ²⁾

【毒性、用途】

〔毒性〕

ACGIH：日本産業衛生学会の許容濃度 規定なし
水生生物に対して毒性がある。²⁾

〔実験動物に対する急性毒性情報〕¹⁾

藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* 96 時間 EC₅₀（生長阻害）：3,700 µg/L

甲殻類 *Daphnia magna* 48 時間 EC₅₀ (遊泳阻害) : 33,900 µg/L
魚類 *Oryzias latipes* 96 時間 LC₅₀ : 110,000 µg/L 超

〔用途〕

化学物質の原料、紙が湿った際に強度をもたせる湿潤強化剤、潤滑油添加剤、キレート剤や界面活性剤などの原料。エポキシ樹脂の硬化剤、水道に使用する管類やバルブ類などの内側に使用するエポキシ樹脂塗料の硬化剤¹⁾、一部の泡消火剤に含まれる。

〔その他〕

水道水質基準の要検討項目に位置づけられている。なお、水環境保全に向けた取組のための要調査項目に選定されていたが、平成 26 年 3 月改訂の要調査項目リストから除外された。平成 30 年 7 月に劇物指定された。

出典

- 1) 環境省：化学物質ファクトシート (<https://www.env.go.jp/chemi/report/h27-01/pdf/chpt1/1-2-3-03.pdf>)
- 2) 国際化学物質安全性カード：日本語版 ICSCs データベース、国立医薬品食品衛生研究所提供

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料はトリフルオロ酢酸添加して保存する。サロゲート内部標準物質を添加して混合した水質試料の一部を固相カートリッジに通水し、高濃度のトリフルオロ酢酸水溶液で溶出する。抽出液を LC/MS/MS(ESI-positive)で測定する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

トリエチレンテトラミン	: Merck 製 >97.0%
トリエチレンテトラミン- <i>d</i> ₄ -四塩酸塩	: Toronto Research Chemicals 製
メタノール	: 富士フイルム和光純薬工業製 LC/MS 用
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬工業製 LC/MS 用

0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸水溶液	: Merck 製 LiChrosolv™ 液体クロマトグラフィー用高純度溶媒
0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸アセ トニトリル溶液	: Merck 製 LiChrosolv™ 液体クロマトグラフィー用高純度溶媒
トリフルオロ酢酸	: 富士フイルム和光純薬工業製 特級
精製水	: 富士フイルム和光純薬工業製 超純水 PFOS、PFOA 測定用
固相抽出カートリッジ	: Waters 製 OASIS HLB PRiME 200 mg 6 cc

【標準液の調製】

〔標準液〕

トリエチレンテトラミン 10.0 mg を量り取り、メタノール 10 mL に溶解して 1000 µg/mL の標準原液を調製する。この標準原液を精製水で希釈して、1.0 µg/mL の標準液を調製する。保存容器はプラスチック製を用いる（注 1）。

〔サロゲート内標準液〕

トリエチレンテトラミン-*d*₄-四塩酸塩を量り取り、精製水に溶解して 1000 µg/mL のサロゲート内標準原液を調製する。このサロゲート内標準原液を精製水で希釈して、トリエチレンテトラミン-*d*₄として 10 µg/mL のサロゲート内標準液を調製する。保存容器はプラスチック製を用いる（注 2）。

〔5% (v/v)トリフルオロ酢酸水溶液（5% TFA 水溶液）〕

約 19 mL の精製水に 1 mL のトリフルオロ酢酸を添加して混合して 20 mL とし、5% (v/v)トリフルオロ酢酸水溶液（5% TFA 水溶液）を調製する（注 3）。

〔検量線用標準液の調製〕

標準液(1.0 µg/mL)とサロゲート内標準液(10 µg/mL)を 5% TFA 水溶液で適宜希釈・混合して、0.50～50 ng/mL（トリエチレンテトラミン-*d*₄ 10 ng/mL）の検量線用標準液を調製する（注 4）。

【試薬の安全性・毒性】

トリエチレンテトラミンは中毒の危険性があるので、標準試薬を取り扱うときはドラフトの中で行うなど室内を汚染しないよう注意する。

対象物質は、ガラス容器保管中に濃度が低下する傾向が見られる。高濃度の標準液の調製や短時間の希釈作業にガラス製品を使用しても問題ないが、保存にはプラスチック製容器を用いる。

【器具】（注 5）

サンプル瓶、試験管（プラスチック製（ポリプロピレン樹脂：PP、ポリエチレン樹脂：PE またはポリフッ化樹脂：PFA など））、PP バイアル、注射筒、カートリッジアダプター

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従う。試料はプラスチック製容器（注 1）に採取して、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液を試料水 1 L あたり 5 mL 添加し、分析まで冷暗所に保存する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

固相抽出カートリッジをアセトニトリル 5 mL、5%TFA 水溶液 2 mL、精製水 5 mL で順次コンディショニングする。【試料の採取及び保存】で処理した試料液 100 mL にサロゲート内標準液(10 µg/mL)を 20 µL 添加して、よく混合する。コンディショニングした固相カートリッジに試料液 5.0 mL を通水する。続いて固相カートリッジを精製水 5 mL で洗浄し、さらに空気を通じて間隙水を除く。固相カートリッジから、5%TFA 水溶液で溶出させ、1.0 mL に定容したものを試験液とする（注 6）。試験液を LC/MS/MS-SRM (selected reaction monitoring)で測定し定量する。

【空試験液の調製】

水質試料の代わりに 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液を 1 L あたり 5 mL 添加した精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕（注 7）

使用機種	： 島津製作所製 LCMS-8050
使用カラム	： Merck 製 Supelco Discovery HS F5-3 (2.1 mm ×150 mm, 3 µm)
カラム温度	： 40°C
移動相	： A : 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液 B : 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液 0.0 → 3.0 min A: B=99.5:0.5

	3.0→ 8.0 min	A:99.5→10 , B:0.5→90	linear gradient
	8.0→12.0 min	A:B=10:90	
	12.0→12.5 min	A:10→99.5 , B:90→0.5	linear gradient
カラム流量	12.5→20.0 min	A:B=99.5:0.5	
	: 0.2 mL/min		
注入液量	: 10 μ L		
イオン化法	: ESI-positive		
インターフェイス電圧	: 4.0 kV		
コリジョンエネルギー	: 13eV (定量イオン及び TETA- d_4)、 23eV (確認イオン)		
インターフェイス温度	: 300°C		
脱溶媒ライン温度	: 250°C		
ヒートブロック温度	: 400°C		
ネブライザー流量	: 3.0 L/min		
乾燥ガス流量	: 10.0 L/min		
加熱ガス流量	: 10.0 L/min		
コリジョンガス	: Ar (270 psi)		
モニターイオン	: トリエチレンテトラミン m/z 147.15 >87.10 (定量)、 m/z 147.15 >44.10 (確認) トリエチレンテトラミン- d_4 m/z 151.20 >91.10		

〔検量線〕

標準液 10 μ L を LC/MS に注入して分析する。対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 10 μ L を LC/MS に注入して分析する。得られた対象物質のピーク面積とサロゲート内標準のピーク面積の比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度 C (ng/L) は次式から算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めた試料液中のサロゲート内標準に対する対象物質の濃度比

Q: 試料中に添加したサロゲート内標準の量(ng)
 (= 添加したサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の量 (μL))

V: 試料量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

Q = 200 (ng)

(= 添加したサロゲート内標準液の濃度 (10 ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の量 (20 μL))

V = 0.10 (L)

即ち、

$$C = R \times 2000 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限値 (IDL)〕

本分析に用いた LC/MS の IDL を表 1 に示す (注 8)。

表 1 IDL 算出の結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	分取量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
TETA	0.50	0.10	5.0	1.0	0.010

〔分析方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法の MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 9)。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料量 (L)	分取量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
TETA	0.10	5.0	1.0	0.012	0.031

注 解

- (注1) ガラス容器では、濃度が低下するので、プラスチック製（ポリプロピレン樹脂：PP、ポリエチレン樹脂：PE またはポリフッ化樹脂：PFA など）容器などを用いる。
- (注2) 入手した安定同位体標識物質は四塩酸塩であり、1.97 mg/mL がトリエチレンテトラミン-*d*₄として 1000 µg/mL に相当する。
- (注3) 発熱があるので、操作は慎重に行う。
- (注4) 測定バイアルは、PP バイアル（ポリプロピレン樹脂製）を用いる。本法では、標準液、試験液に TFA が添加されており、ガラスバイアルを使用しても問題は起こらなかったが、避けたほうが安全と思われる。
- (注5) マイクロシリンジ及びマイクロピペットを使用する場合には精度管理されたものを用いることを基本とし、測定誤差 2%以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注6) 固相カートリッジを完全に乾燥させる必要はなく、やや水分が残留している。溶出液が 1 mL 弱になるように溶出し、ごくわずかの溶出液で 1.0 mL に定容するとよい。
- (注7) LC/MS/MS の条件は、本測定に使用した機種（島津製作所製 LCMS-8050）の例である。

(注 8) IDL は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	TETA
試料量 (L)	0.10
分取量 (mL)	5.0
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.50
注入量 (pg)	5.0
装置注入量 (μL)	10
結果 1 (pg)	5.04
結果 2 (pg)	5.05
結果 3 (pg)	5.09
結果 4 (pg)	5.25
結果 5 (pg)	4.88
結果 6 (pg)	4.91
結果 7 (pg)	4.93
平均値 (pg)	5.022
標準偏差(σ_{n-1}) (pg)	0.130
IDL (pg)*	0.50
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.010
S/N 比	18
CV(%)	2.6

$$*IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

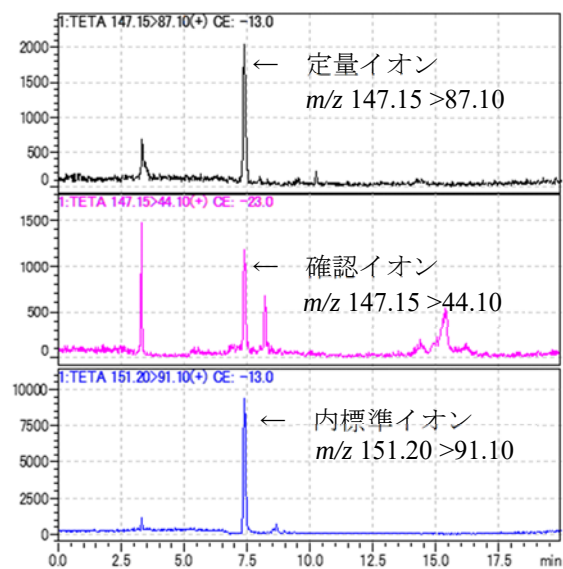


図1 IDL 測定時のクロマトグラム
(対象物質濃度：0.50 ng/mL、サロゲート内標準濃度：10 ng/mL)

(注 9) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)により、表 4 のとおり算出した。MDL 測定時のクロマトグラムを図 2 に示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) *1

物質名	TETA	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	河川水	-	-
試料量 (L)	0.10	-	-
標準添加量(ng)	10	-	-
試料換算濃度(μg/L)	0.10	-	-
分取量(mL)	5.0	-	-
最終液量 (mL)	1.0	-	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	-	-
装置注入量 (μL)	10	-	-
操作ブランク平均 (μg/L)*2	<0.012	-	80
無添加平均 (μg/L)*3	<0.012	-	55
結果 1 (μg/L)	0.105	105	53
結果 2 (μg/L)	0.100	100	55
結果 3 (μg/L)	0.105	105	57
結果 4 (μg/L)	0.105	105	61
結果 5 (μg/L)	0.101	101	58
結果 6 (μg/L)	0.108	108	55
結果 7 (μg/L)	0.101	101	71
平均値 (μg/L)	0.1037	104	56.9
標準偏差 (σ _{n-1})(μg/L)	0.00312		
MDL (μg/L)*4	0.012		
MQL (μg/L)*5	0.031		
S/N 比	10		
CV(%)	3.0		

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値。

*2 : 空試験液を測定した値の平均値 (n = 2)

*3 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 2)

*4 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

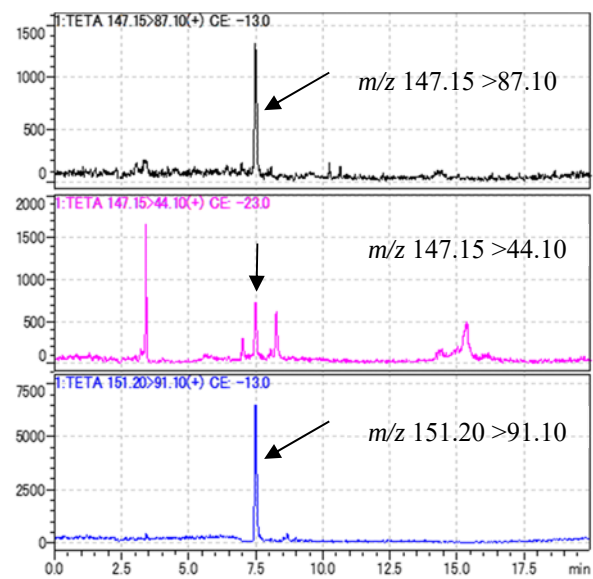


図2 MDL 測定時のクロマトグラム
 (対象物質濃度：0.50 ng/mL、サロゲート内標準濃度：10 ng/mL)

解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

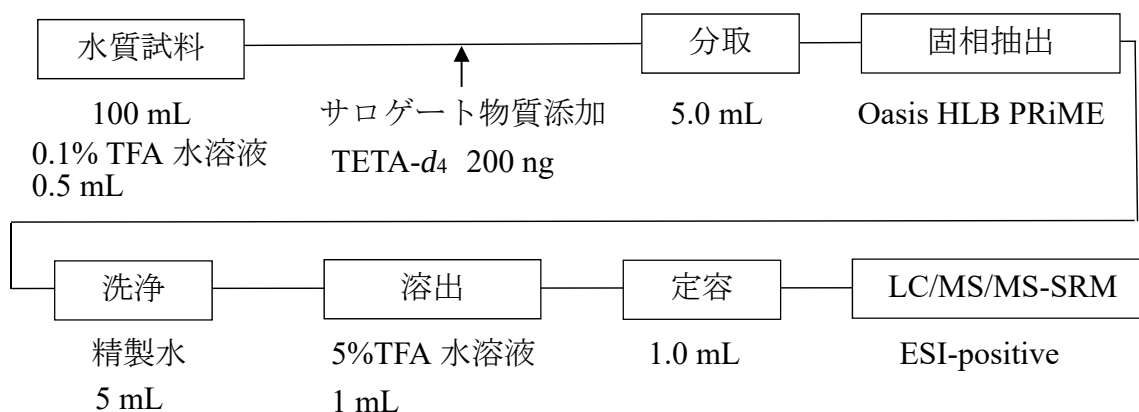


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図4-1、4-2に、検量線作成用データを表5に示す。

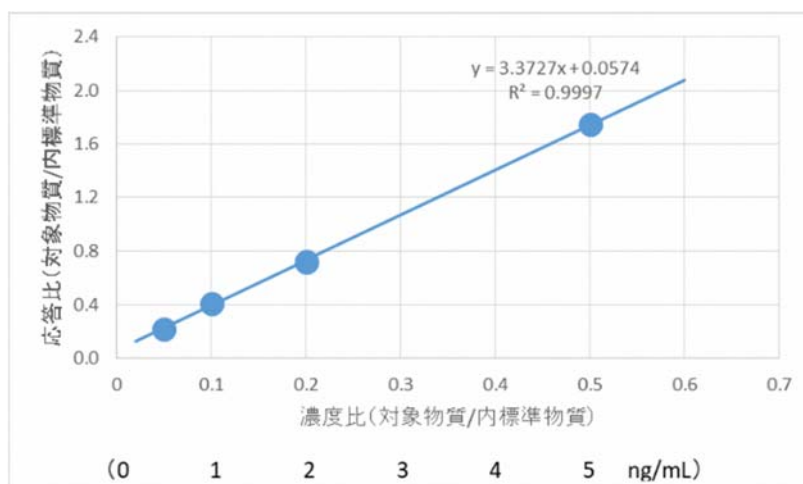


図4-1 低濃度域検量線 (TETA : 0.50~5.0 ng/mL)
(サロゲート内標準濃度 : 10 ng/mL)

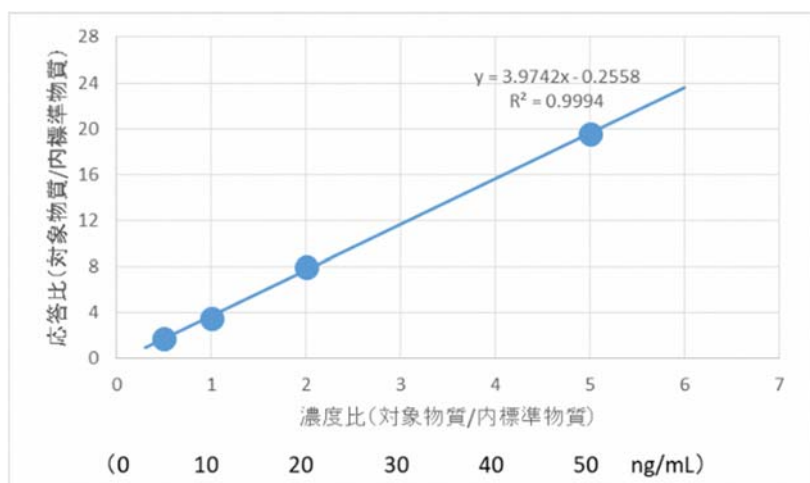


図4-2 高濃度域検量線 (TETA : 5.0~50 ng/mL)
(サロゲート内標準濃度 : 10 ng/mL)

表5 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	濃度比	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質(As)	サロゲート内標準(Ais)	
		TETA (m/z 147.15>87.10)	TETA-d ₄ (m/z 151.20>91.10)	
0.50	0.05	15449	69544	0.22
1.0	0.10	28086	68688	0.41
2.0	0.20	47092	65510	0.72
5.0	0.50	106926	61221	1.7
10	1.0	124519	35511	3.5
20	2.0	460837	57949	8.0
50	5.0	1195096	61123	20

* : サロゲート内標準濃度 : 10 ng/mL

[クロマトグラム]

標準液のクロマトグラムを図5に示す。

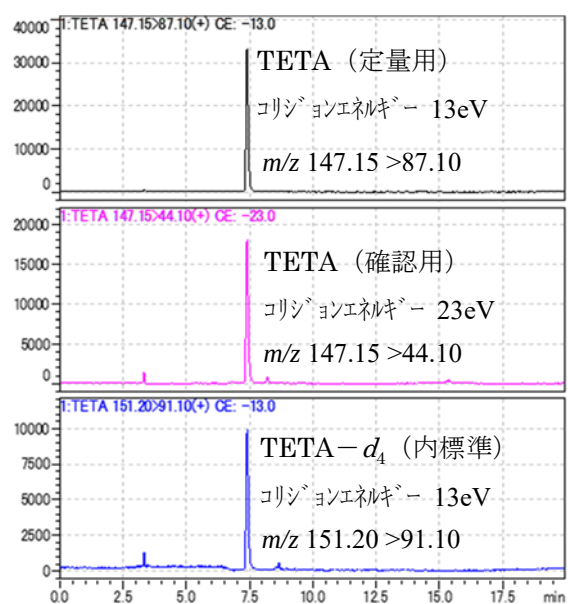


図5 標準液のクロマトグラム
(対象物質濃度：10 ng/mL、サロゲート内標準濃度：10 ng/mL)

[マスペクトル]

標準物質のスペクトルを図 6-1~図 6-5 に示す。

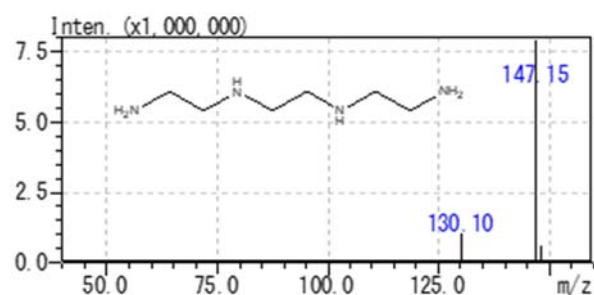


図 6-1 TETA のマスペクトル(ESI positive)

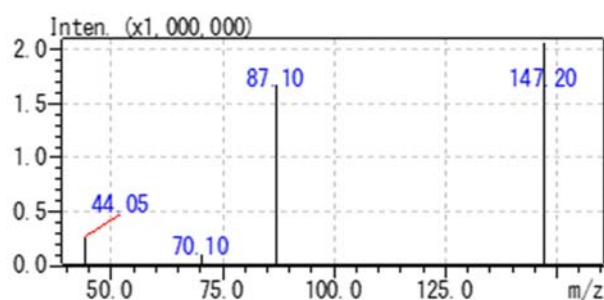


図 6-2 m/z147 をプレカーサーイオンとしたときのプロダクトイオンスペクトル (CE=13 eV)

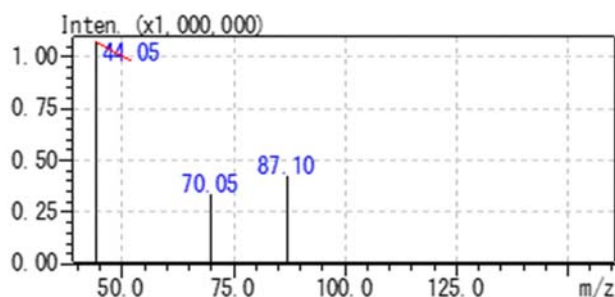


図 6-3 m/z147 をプレカーサーイオンとしたときのプロダクトイオンスペクトル (CE=23 eV)

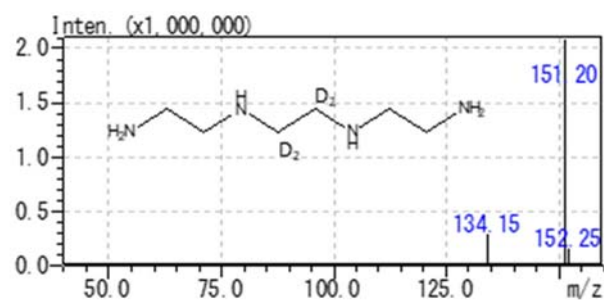


図 6-4 TETA-d₄ のマスペクトル(ESI positive ESI)

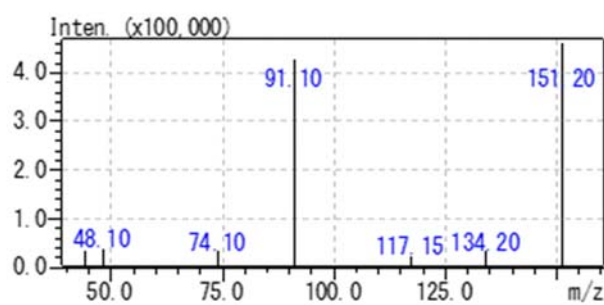


図 6-5 m/z 151 をプレカーサーイオンとしたときのプロダクトイオンスペクトル
(CE=13 eV)

〔操作ブランク〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 7 に示す。対象物質は不検出(<0.012 $\mu\text{g/L}$)であった。

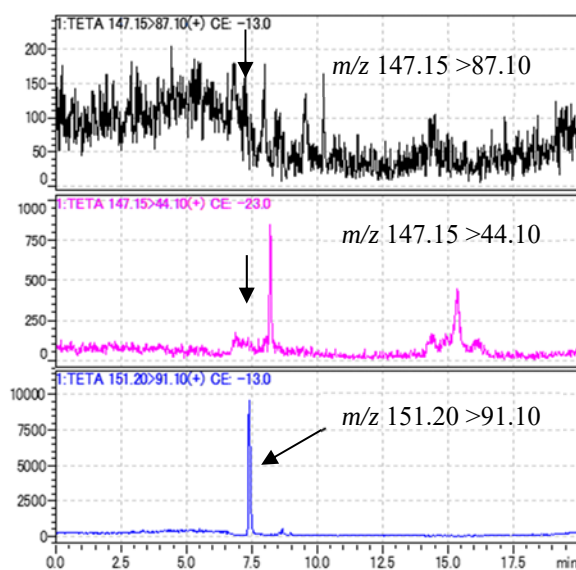


図 7 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

精製水、河川水（平作川）及び海水（東京湾）への添加回収試験の結果を表6及び図8-1～8-4に示す。

表6 添加回収試験の結果

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	分取量 (mL)	最終液量 (mL)	試験 数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	CV (%)	サロゲート 回収率(%)	サロゲート CV(%)
精製水	100	0	5.0	1.0	2	<0.012	-	-	80.4	-
	100	200	5.0	1.0	2	2.02	101	-	100	-
河川水	100	0	5.0	1.0	2	<0.012	-	-	55.0	-
	100	10	5.0	1.0	7	0.10	104	3.1	58.6	5.9
	100	200	5.0	1.0	2	1.96	97.9	-	81.7	-
海水	100	0	5.0	1.0	1	<0.012	-	-	86.8	-
	100	200	5.0	1.0	2	2.00	100	-	77.0	-

*検出濃度はサロゲート補正値

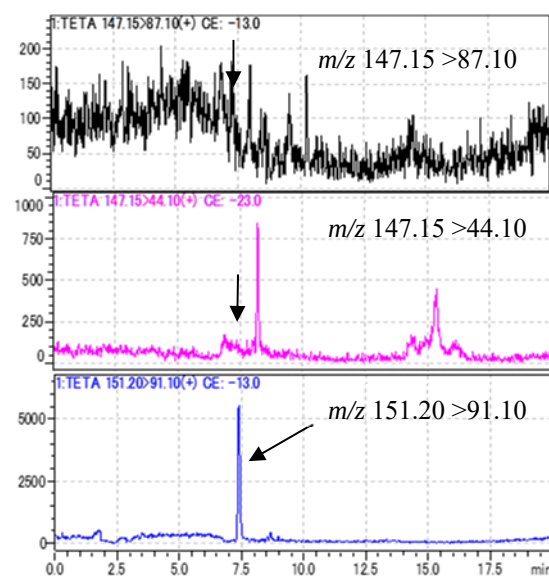


図8-1 添加回収試験のクロマトグラム
(河川水、無添加、平作川)

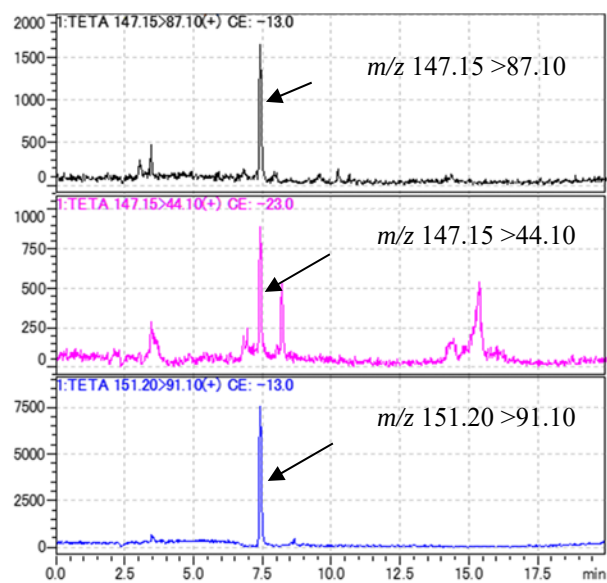


図 8-2 添加回収試験のクロマトグラム
(河川水、10 ng 添加、平作川)

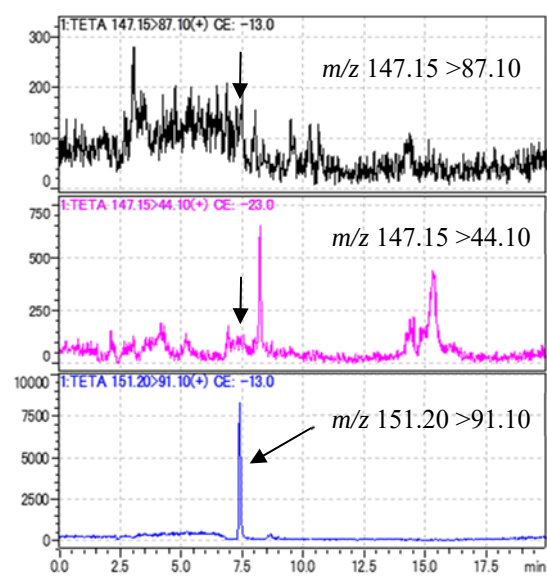


図 8-3 添加回収試験のクロマトグラム
(海水、無添加、東京湾)

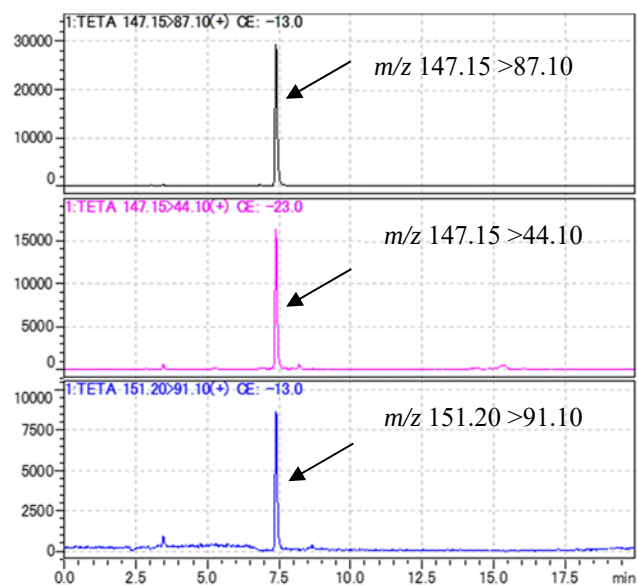


図 8-4 添加回収試験のクロマトグラム
(海水、200 ng 添加、東京湾)

〔分解性スクリーニング〕

分解性スクリーニングの結果を表 7 に示す。このようにいずれの条件でも濃度の低下が見られ、塩基性で大きいようだった。

表 7 分解性スクリーニングの結果

物質名	pH	試験 数	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	検出濃度($\mu\text{g/L}$) (残存率 (%)*)		
				1 時間後	7 日後	
					暗所	明所
TETA	5	2	10	10.1(101)	8.7(87)	-
	7	2	10	10.1(101)	8.5(85)	8.4(84)
	9	2	10	7.9(79)	6.1(61)	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

試料、試験液及び標準液の保存性試験結果を表 8 に示す。試料については、**【試料の採取及び保存】**に示したように、対象物質を添加した水質試料を冷蔵庫保存した後、測定した。サロゲート内標準物質は、測定当日に添加した。TFA 添加、無添加の場合を比較した。TFA を添加すると濃度低下が抑えられたが、無添加の場合は対象物質の濃度の明らかな低下が見られた。保存性は TFA 0.0005% 試料液が TFA 0.0002% 試料液に比較して良好であった。しかし、2 倍に当たる 0.001% TFA 溶液では、固相濃縮の過程において、固相に保持しきれなかった。これらの結果から、試料水は 0.0005% 相当の TFA を添加して冷暗所に保存し、可能な限り速やかに（海水の場合は 3 日以内）に前処理する必要があることが分かった。また、TFA を添加してからは、試料採取容器の材質での差異（ガラス製、ポリエチレン樹脂製、ポリフッ化樹脂製）は確認されなかった。試験液については、添加回収試験から得られた試験液をバイアル瓶に入れたまま LC/MS 装置のサンプルトレイに置き、表 8 に記載した日数後に測定した。つまりサロゲート内標準物質は初日に添加されたままである。サロゲート内標準物質の回収率が 50% を下回った場合は、サロゲート補正は行わず、絶対検量線法で定量した。標準液については検量線用標準液を試験液と同様に扱い測定した。対象物質は、試験液中では 14 日間、標準液では 1 ヶ月間は保存できることが分かった。

表 8 保存性試験結果

試料名	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	検出濃度($\mu\text{g/L}$) (残存率(%)*)				
		当日	3 日間	7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水 試料（そのまま）	2.0	-	-	0.76(38)	-	-
	TFA 0.0002% 添加	2.0	-	1.6(79)	-	1.6(81)
	TFA 0.0005% 添加	2.0	-	-	1.8(90)	2.0(100)
海水 試料（そのまま）	2.0	-	-	0.40(20)	-	-
	TFA 0.0005% 添加	2.0	2.0(100)	1.7(85)	1.4(68)**	-
河川水 試験液	0.50	0.50(100)	-	0.52(103)	0.50(100)	-
海水 試験液(ガラスバイアル)	10	9.2(92)	-	10(102)	10(104)	-
	試験液 (PP バイアル)	10	10(100)	-	10(105)	10(100)
標準液 MDL の 10 倍程度	0.50	0.51(101)	-	-	-	0.52(103)
検量線の最高濃度	50	50(100)	-	-	-	51(103)

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

**サロゲート補正せず（その他のサロゲート回収率は、53.9～129%）

〔溶出液量の検討〕

コンディショニングした固相カートリッジに対象物質を添加し、5%TFA 水溶液で溶出させたときの画分毎の回収率を図 9 に示す。1 mL 以下で対象物質の大半は溶出する。溶出液は 1 mL に満たない量とし、5%TFA 水溶液で 1.0mL に定容した。

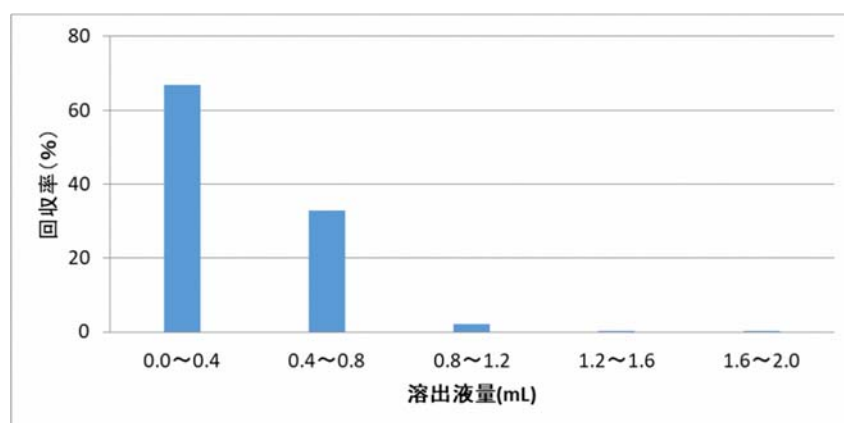


図 9 溶出液量と回収率の関係

〔環境試料の分析例〕

本法を用いて河川水（平作川、図 8-1）及び海水（東京湾、図 8-3）を測定した。いずれも対象物質は MDL 未満(< 0.012 µg/L)であった。

【評価】

本分析法で用いた LC/MS/MS でのトリエチレンテトラミンの IDL は 0.50 pg（試料換算濃度は 0.010 µg/L）であり、0.50～50 ng/mL の範囲で検量線の直線性が確認された。MDL は 0.012 µg/L、MQL は 0.031 µg/L であった。河川水にトリエチレンテトラミンの濃度が 0.10 µg/L となるよう添加した際の回収率は、104%（河川水、変動係数 3.1%、サロゲート回収率 58.6%、変動係数 5.9%）となった。本法で環境試料を分析した結果、神奈川県内の河川水（平作川）および海水（東京湾）からは、MDL 未満であった。以上の結果から、本法は水質試料中にトリフルオロ酢酸を添加する（0.0005%濃度）ことにより、試料水に含まれる 0.03 µg/L 程度の対象物質の定量分析に適用できると考えられる。

【参考文献】

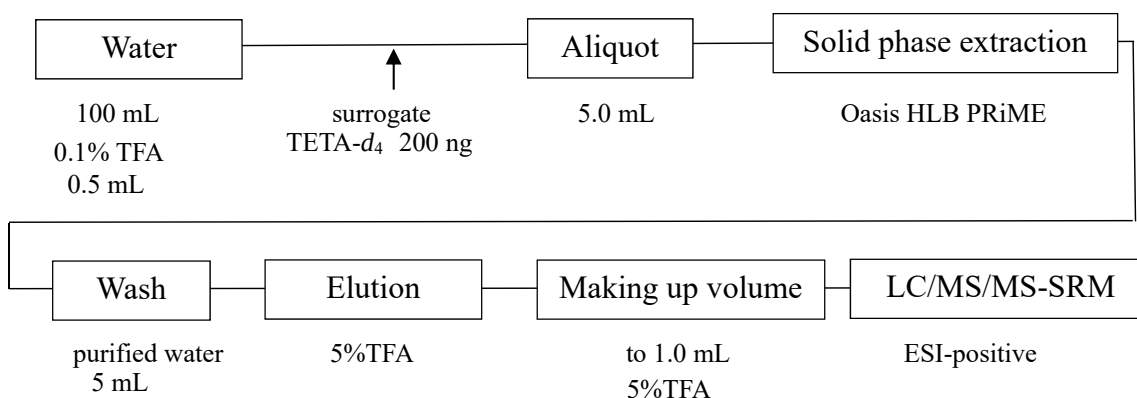
平成 24 年度 環境省請負業務報告書 水環境中の要調査項目等存在状況調査業務報告書、いであ株式会社（2017.3）

【担当者連絡先】

所属先 : 神奈川県環境科学センター
所属先住所 : 〒254-0014 平塚市四之宮 1-3-39
TEL : 0463-24-3311 FAX : 0463-24-3300
担当者名 : 調査研究部 長谷川敦子
E-mail : hasegawa.j3i@pref.kanagawa.jp

Triethylenetetramine

An analytical method is presented for the determination of triethylenetetramine in environmental water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) in electrospray ionization (ESI) positive mode. Precursor ion chromatography of m/z 147 > 87 and m/z 147 > 44 is applied for analysis of triethylenetetramine. Sample solutions of 0.0005% trifluoroacetic acid (TFA) are prepared by addition of TFA solution. After addition of the internal standard of triethylenetetramine- d_4 , 5 mL aliquot of the sample solution passed through a solid phase extraction cartridge (Waters, OASIS HLB PRiME, 200 mg, 6cc) The targets (triethylenetetramine and triethylenetetramine- d_4) are eluted with 1 mL of 5% TFA solution. The eluate is determined by LC/MS/MS-selected reaction monitoring (SRM) analysis. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.012 $\mu\text{g/L}$ and 0.031 $\mu\text{g/L}$, respectively. The recovery of target from river water was 104% (CV 3.1%), surrogate recovery was 58.6% (CV 5.9%). The concentrations of target in river and sea waters at Kanagawa area were less than 0.012 $\mu\text{g/L}$ (MDL).



物質名	分析法フローチャート	備 考
トリエチレンジアミン 別名： TETA、3,6-ジエチレンジアミン、<i>N,N'</i>-ビス(2-アミノエチル)-1,2-エタンジアミン IUPAC 名：<i>N,N'</i>-bis(2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine	【水質】 <pre> graph TD A["水質試料 100 mL 0.1% TFA 水溶液 0.5 mL"] --> B["分取 5.0 mL"] C["サロゲート内標準 TETA-d4 200 ng"] --> B B --> D["固相抽出 Oasis HLB PRiME"] D --> E["洗浄 精製水 5 mL"] E --> F["溶出 5%TFA 水溶液"] F --> G["定容 1.0 mL 5%TFA 水溶液"] G --> H["LC/MS/MS-SRM ESI-positive"] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-Positive 検出下限値： 【水質】(μg/L) 0.012 分析条件： 機器 LC/MS： Shimadzu製 LCMS-8050 カラム Merck 製 Supelco Discovery HS F5-3 (2.1 mm ×150 mm, 3 μm)

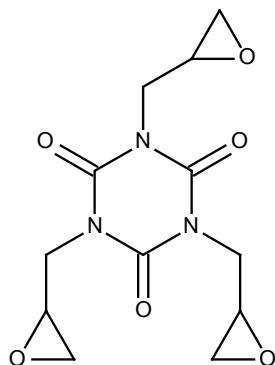
1,3,5-トリス(2,3-エポキシプロピル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6 (1*H*,3*H*,5*H*)-トリオン

1,3,5-Triglycidyl isocyanurate

IUPAC 名：1,3,5-Tris(2,3-oxiranylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6 (1*H*,3*H*,5*H*)-trione

別名：TGIC、イソシアヌル酸トリグリシジル、トリス(エポキシプロピル)イソシアヌラート

【対象物質の構造】



CAS 番号：2451-62-9

分子式：C₁₂H₁₅N₃O₆

【物理化学的性状】

物質名	TGIC
分子量	297.26
モノアイソトピック質量	297.09612
融点	95°C ¹⁾
沸点	—
蒸気圧	7.2×10 ⁻⁶ Pa (工業品グレード) ²⁾
溶解性	10.1 g/L (α型)、0.53 g/L (β型) ²⁾
	0.9 g/100 mL (工業用) ¹⁾
密度	1.5 g/cm ³ (工業品グレード) ³⁾
log P _{ow}	-0.8 ¹⁾

【毒性、用途】

〔毒性〕

ACGIH(2001)、TLV : 0.05 mg/m³ (TWA) ¹⁾

日本産業衛生学会の許容濃度：規定なし、発がん性認められず

実験動物に対する急性毒性情報：データなし

〔用途〕

紛体塗料（ポリエステル系の硬化剤）、溶剤（はんだ）レジストインク、
光半導体封止樹脂、主に樹脂の硬化剤 ⁴⁾

出典

- 1) 国際化学物質安全性カード：

(https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=ja&p_card_id=1274&p_version=2 から引用)

- 2) IPCS, International Programme on Chemical Safety (1998) Triglycidyl isocyanurate. Concise International Chemical Assessment Document 8, WHO, Geneva. (<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad8.htm> から引用)
- 3) IPCS, International Programme on Chemical Safety (1999) ICSC, International Chemical Safety Cards, Geneva. (<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/index.htm> から引用)
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

§1 分析法

(1) 分析法の概要

大気試料を固相カートリッジで捕集し、メタノールで溶出し、定容後、LC/MS/MS-SRM (ESI-positive) で測定する。対象物質は変質しやすいので、分析はなるべくすみやかに行う。

(2) 試薬・器具

【試薬】

TGIC	: 東京化成工業製 > 98.0%
メタノール	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
1 mol/L ギ酸アンモニウム	: 富士フイルム和光純薬製
水溶液	高速液体クロマトグラフ用
精製水	: 富士フイルム和光純薬製 超純水
	PFOS、PFOA 測定用
固相カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak Silica plus long, 690 mg

【標準液の調製】

〔標準液〕

TGIC 100 mg を正確に量り取り、メタノールに溶解して 100 mL として、1000 µg/mL の TGIC 標準原液を調製する。標準原液をメタノールで希釈し、0.10 µg/mL 及び 1.0 ng/mL に調製したものを TGIC 標準液とする。

〔検量線用標準液の調製〕

0.10 µg/mL と 1.0 ng/mL の標準液をメタノールで適宜希釈したものを検量線用標準液とする。各濃度の検量線用標準液は、TGIC として 0.10～10 ng/mL に相当するように調製する。

【器具】（注 1）

試験管または濃縮管(10 mL)、5 mL ガラス製注射筒、メスフラスコなどの定量器具

【試薬の安全性・毒性】

高濃度では中毒の危険性があるので、標準試薬などを取り扱うときはドラフトの中で行うなど室内を汚染しないよう十分留意する。

(3)分析法

【試料採取の準備】

Waters製 Sep Pak Silica plus long, 690 mgを捕集管とする。捕集管に注射筒を取り付け、メタノール15 mLで洗浄する。メタノールは自然落下するが、時間がかかりすぎる場合は、加圧してもよい。空気を通気してメタノールを除去・乾燥し（注2）、両端にキャップをはめ、アルミパックなどに密封し、試料採取まで汚染を受けないように保存する。

【試料の採取及び保存】

捕集管をポンプと接続し、0.5 L/min の流速で大気を 24 時間通気して採取する。大気試料を採取した捕集管は、両端にキャップをはめ、分析時までアルミパックなどで密閉し冷蔵する。

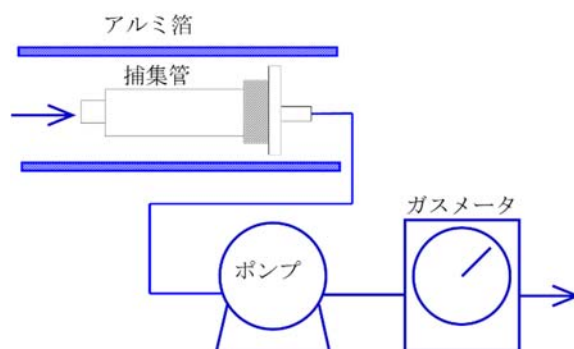


図1 試料採取装置

【試料の前処理及び試験液の調製】

試料を捕集した捕集管の上流に注射筒を取り付け、メタノールを 1.2 mL ほど入れて溶出し（注3）、溶出液をメタノールで 1.0 mL に定容したものを試験液とする。

【空試験液の調製】

大気試料を捕集していない捕集管を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕（注 4）

使用機種	: 島津製作所製 LCMS-8050
使用カラム	: Waters 製 Cortecs C18+ (150 mm × 2.1 mm , 2.7 μm)
カラム温度	: 40°C
移動相	: A : 0.05 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B : メタノール 0.0 → 3.0 min A:90→10 , B:10→90 linear gradient 3.0 → 5.0 min A:B=10:90 5.0 → 5.5 min A:10→90 , B:90→10 linear gradient 5.5 → 15 min A:B=90:10
カラム流量	: 0.2 mL/min
注入液量	: 2 μL
イオン化法	: ESI(Electrospray Ionization)-positive
インターフェイス電圧	: 4.0 kV
コリジョンエネルギー	: -21 eV (定量イオン) -24 eV (確認イオン)
インターフェイス温度	: 300°C
脱溶媒ライン温度	: 250°C
ヒートブロック温度	: 400°C
ネブライザーガス流量	: 3.0 L/min
乾燥ガス流量	: 10.0 L/min
加熱ガス流量	: 10.0 L/min
コリジョンガス	: Ar (270 psi)
測定モード	: SRM(Selected Reaction Monitoring)
TGIC モニターイオン	: m/z 315.10 > 130.05 (m/z 315.10 = [M+NH ₄] ⁺ 、定量用) m/z 315.10 > 82.05 (確認用) (注 5)

〔検量線〕

標準液 2.0 μL を LC/MS/MS に注入して分析する。対象物質の濃度と得られたピーク面積から検量線を作成する。

〔定量〕（注 6）

試験液 2.0 μL を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた対象物質のピーク面積を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

大気試料中の濃度 C (ng/m³) は次式から算出する。

$$C = R \cdot E / V \times (273 + t) / (273 + 20.0) \times (101 / P)$$

R ：検量線から求めた試料液中の対象物質の濃度 (ng/mL)

E ：試験液量 (mL)

V ：試料量 (m³)

t ：捕集時の平均気温 (°C)

P ：捕集時の平均気圧 (kPa)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$E = 1.0 \text{ (mL)}$$

$$V = 0.72 \text{ (m}^3\text{)}$$

即ち、

$$C = R \times 1.39 \times (273 + t) / (273 + 20.0) \times (101 / P) \text{ (ng/m}^3\text{)}$$

である。

〔装置検出下限 (IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を下記に示す (注 7)。

表 1 IDL 算出の結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (m ³)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/m ³)
TGIC	0.025	0.72	1.0	0.017

〔分析方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法の MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 8)。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料量 (m ³)	最終液量 (mL)	MDL (ng/m ³)	MQL (ng/m ³)
TGIC	0.72	1.0	0.039	0.10

注 解

- (注1) JIS R 3505に記載のクラスAのガラス器具を使用する。マイクロシリンジ及びマイクロピペットを使用する場合には精度管理されたものを用いることを基本とし、測定誤差2%以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注2) 完全に乾燥させる必要はない。注射筒で数mLの空気を送り、メタノールが垂れなくなる程度でよい。
- (注3) 溶出液が1 mL弱になるように溶出し、ごくわずかのメタノールで1.0 mLに定容するとよい。
- (注4) LC/MS/MSの条件は、本測定に使用した機種（島津製作所製LC/MS 8050）の例である。
- (注5) m/z 315 > 298イオンのほうが強度は高いが、ベースラインが高くて定量精度が落ちる。
- (注6) 対象物質は、イオン化抑制を受けやすいので、検出された場合、標準添加法により確認を行う。

(注7) IDLは、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成28年3月)に従って、下記表3のとおり算出した。

表3 IDL の算出結果 (詳細)

対象物質名	TGIC
試料量 (m ³)	0.72
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.10
注入量 (pg)	0.20
装置注入液量 (μL)	2.0
結果 1 (pg)	0.213
結果 2 (pg)	0.215
結果 3 (pg)	0.224
結果 4 (pg)	0.222
結果 5 (pg)	0.224
結果 6 (pg)	0.216
結果 7 (pg)	0.206
平均値 (pg)	0.2172
標準偏差(σ _{n-1}) (pg)	0.00645
IDL (pg)*	0.025
IDL 試料換算値 (ng/m ³)	0.017
S/N 比	19
CV(%)	3.0

* : IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

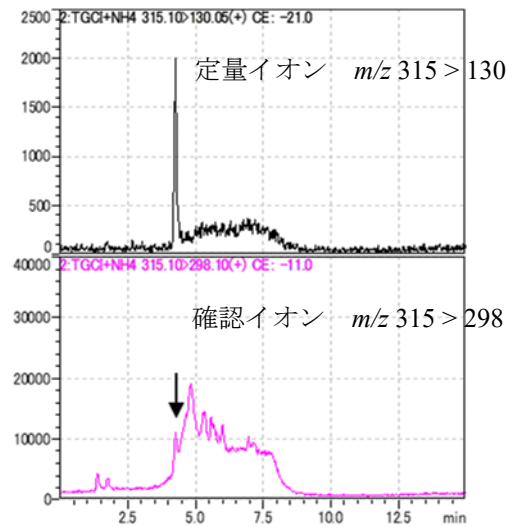


図 2-1 IDL 測定時のクロマトグラム
(対象物質濃度：0.10 ng/mL)

*：IDL 算出時の確認イオンは、 m/z 315 > 298 である。その後 m/z 315 > 82 に変更した。

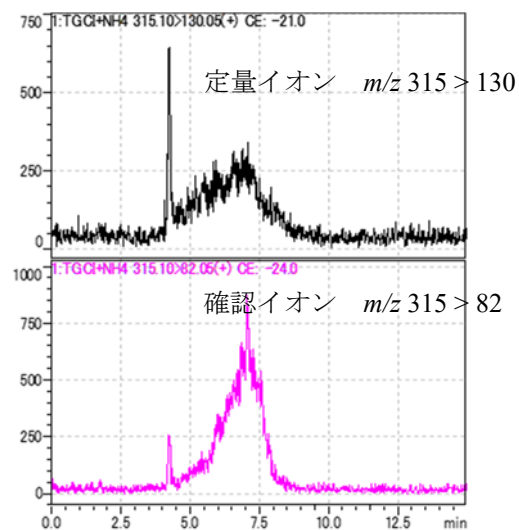


図 2-2 確認イオン変更後(m/z 315 > 82)の同濃度のクロマトグラム
(対象物質濃度：0.10 ng/mL)

(注 8) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 4 のとおり算出した。MDL 測定時のクロマトグラムを図 3 に示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

物質名	TGIC	回収率(%)
試料	環境大気	-
試料量 (m ³)	0.72	-
標準添加量 (ng)	0.10	-
試料換算濃度 (ng/m ³)	0.139	-
最終液量 (mL)	1.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.10	-
装置注入液量 (μL)	2.0	-
操作ブランク平均 (ng/m ³) * ¹	<0.039	-
無添加平均 (ng/m ³) * ²	<0.039	-
結果 1 (ng/m ³)	0.12	87
結果 2 (ng/m ³)	0.12	86
結果 3 (ng/m ³)	0.13	97
結果 4 (ng/m ³)	0.13	92
結果 5 (ng/m ³)	0.12	83
結果 6 (ng/m ³)	0.11	81
結果 7 (ng/m ³)	0.14	100
平均値 (ng/m ³)	0.124	90
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/m ³)	0.0100	
MDL (ng/m ³) * ³	0.039	
MQL (ng/m ³) * ⁴	0.10	
S/N 比	10	
CV (%)	8.1	

*1 : 空試験液を測定した値の平均値(n = 2)

*2 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 2)

*3 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

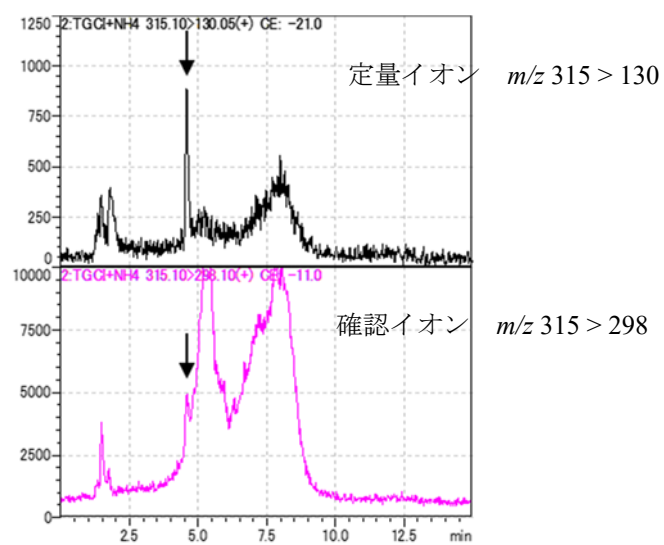


図3 MDL測定時のクロマトグラム（注入液濃度：0.10 ng/mL）

*：MDL算出時の確認イオンは、 m/z 315 > 298 である。その後、妨害ピークの影響を受けにくい m/z 315 > 82 に変更した。（図 9-1 添加回収試験無添加試料のクロマトグラムを参照）。

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図4に示す。

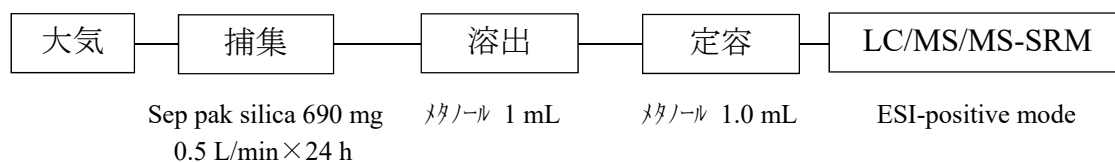


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図5に、検量線作成用データを表5に示す。

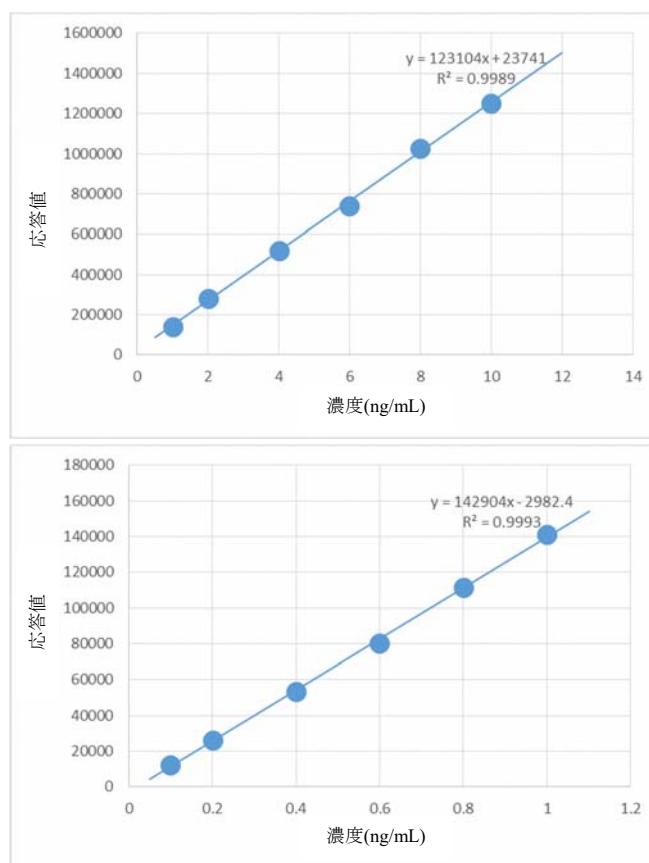


図5 上図：高濃度域検量線 (TGIC : 1.0 ~ 10 ng/mL)、
下図：低濃度域検量線 (TGIC : 0.10 ~ 1.0 ng/mL)

表5 TGIC の検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	応答値 (m/z 315.10 > 130.05)
0.10	12210
0.20	26215
0.40	53552
0.60	80383
0.80	111451
1.0	141297
2.0	281697
4.0	519228
6.0	738355
8.0	1025375
10	1252731

[クロマトグラム]

標準液のクロマトグラムを図 6-1 に示す。また確認イオンを変更した後のクロマトグラムを図 6-2 に示す。

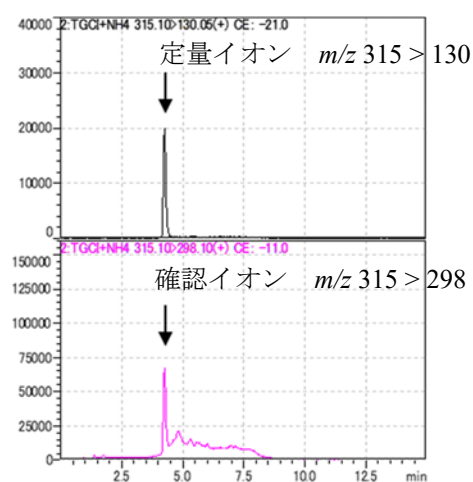


図 6-1 標準液のクロマトグラム（確認イオン変更前(m/z 315 > 298))
(対象物質濃度 : 1.0 ng/mL)

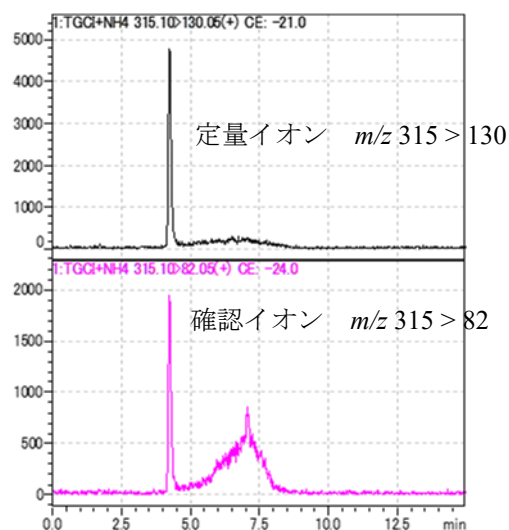


図 6-2 標準液のクロマトグラム（確認イオン変更後(m/z 315 > 82)）
（対象物質濃度：1.0 ng/mL）

〔マススペクトル〕

対象物質のマススペクトルを図 7 に示す。

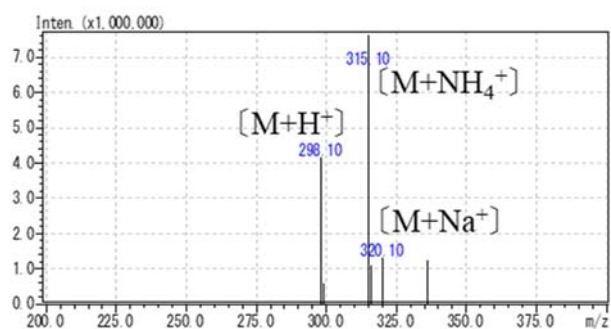


図 7-1 TGIC のマススペクトル(ESI positive)

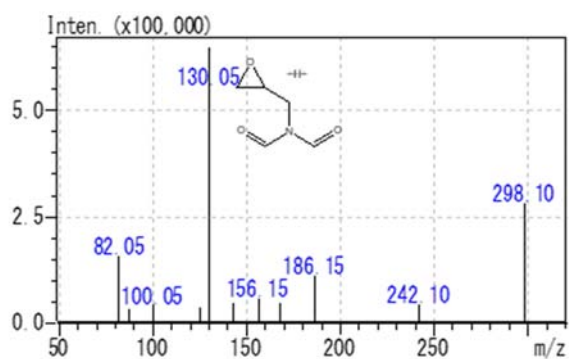


図 7-2 m/z 315 をプレカーサーイオンとしたときのプロダクトイオンスペクトル

〔操作ブランク〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 8 に示す。対象物質は MDL 未満(<0.039 ng/m³)であった。

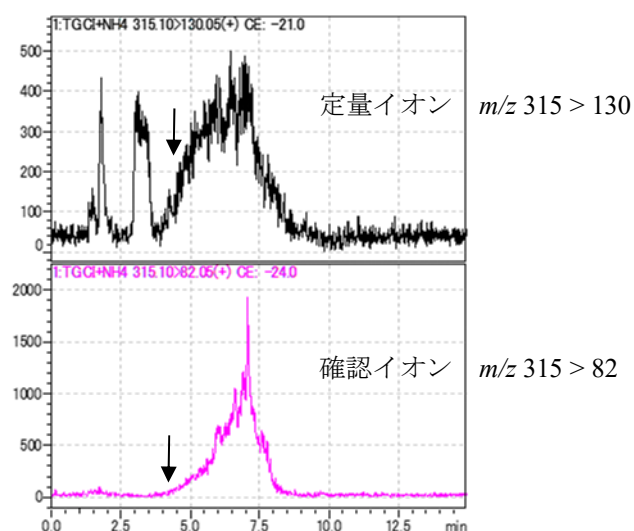


図 8 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

捕集管の上流部分に標準液を添加し、添加回収試験を実施した。表 6 に結果を、図 9 に添加回収試験の際のクロマトグラムを示す。大気試料からの回収率は 90%以上（変動係数 8%）であった。

表 6 添加回収実験結果

試料名	気温 (°C)	湿度 (%)	添加量 (ng)	試験 数	検出量 (ng)	検出濃度 (ng/m ³)	回収率 (%)	変動係数 (%)
環境大気	5～14	42～55	0.0	2	ND	<0.039	–	–
			1.0	2	1.05	1.5	105	–
	25	60	0.0	2	ND	<0.039	–	–
			0.1	7	0.0895	0.12	89.5	8.1
			1.0	5	0.916	1.3	91.6	7.6
	27～34	68～88	0.0	2	ND	<0.039	–	–
			1.0	2	0.908	1.3	90.8	–

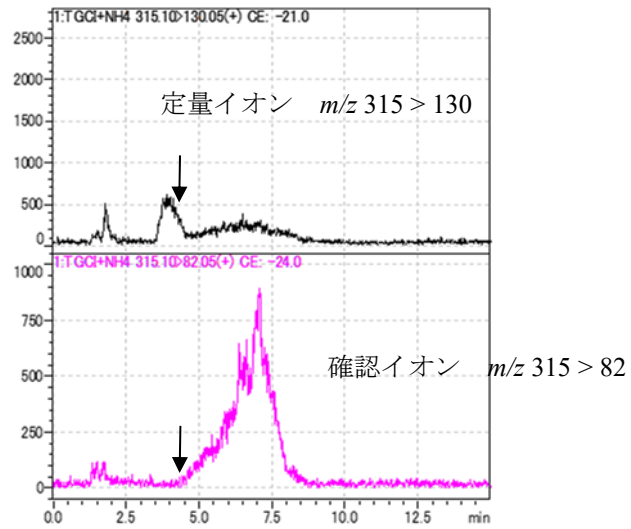


図 9-1 添加回収試験のクロマトグラム
(環境大気、無添加、2020 年 2 月 神奈川県平塚市)

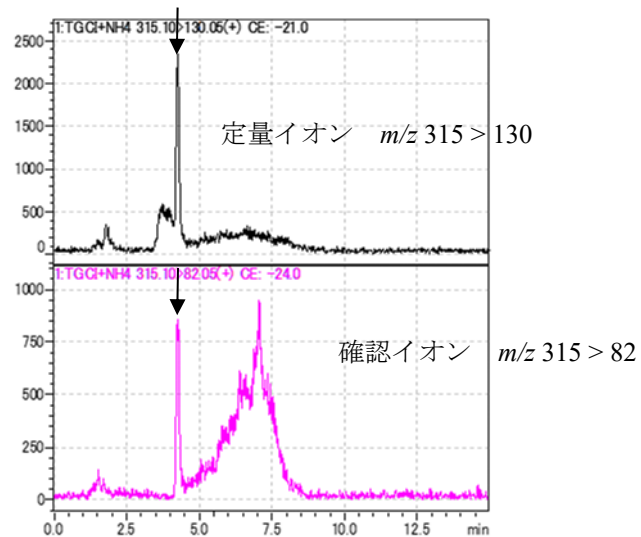


図 9-2 添加回収試験のクロマトグラム
(環境大気、添加 1.0 ng、2020 年 2 月 神奈川県平塚市)

〔保存性試験〕

表 7 に保存性実験結果を示す。14 日間保存した試験液は応答値が 75%に、2 か月ほど経過した標準液（濃度 10 ng/mL、1.0 ng/mL）は 80%以下になった。試験液も標準液も漸減傾向が認められたので、測定は 1 週間以内に済ませる必要がある。標準液は、測定する日に、標準原液から希釈し調製する。

表 7 保存性試験結果

試料名		調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
			7 日間	14 日間	21 日後
環境 大気	捕集管	1.0 (添加量 1.0 ng)	0.991(99)	-	-
	試験液	1.0	0.931(93)	0.752(75)	-
標準液	MDL の 7 倍程度	0.20	0.196(98)	0.198(99)	0.165(83)
	検量線最高濃度	10	9.55(96)	8.61(86)	7.91(79)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔溶出液量の検討〕

固相カートリッジに対象物質を添加し、メタノールで溶出させたときの各画分の回収率の例を図 10 に示す。最初の 0.4 mL で対象物質の 9 割ほど、0.8 mL までに対象物質のほとんどは溶出することがわかった。従って溶出は 1 mL とした。

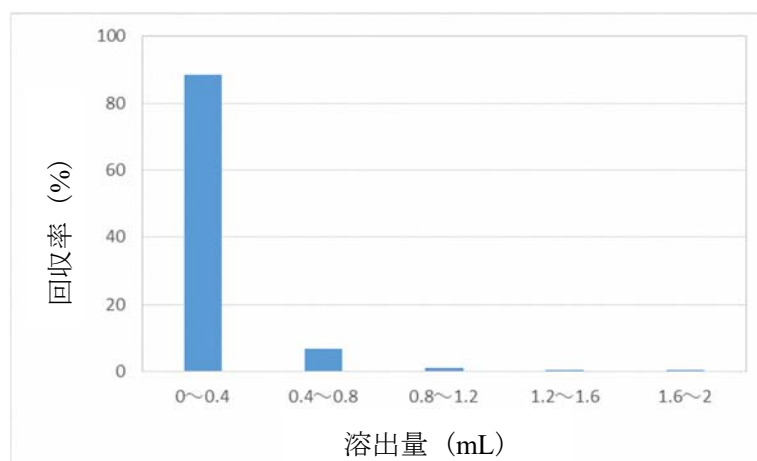


図 10 溶出液量と回収率の関係

〔環境試料の分析例〕

図 9-1 に環境大気のクロマトグラム例を示す。神奈川県平塚市では、すべて

の検体が MDL 未満(<0.039 ng/m³)であった。

【評価】

本分析法で用いた LC/MS/MS での TGIC の IDL は 0.025 pg (試料換算濃度は 0.017 ng/m³) であり、0.10~10 ng/mL の範囲で検量線の直線性 ($R^2=0.9989\sim0.9993$) が確認された。MDL は 0.039 ng/ m³、MQL は 0.10 ng/ m³ であった。捕集管に TGIC を 1.0 ng 添加し (換算濃度がおよそ 1.4 ng/m³、要求感度は 10 ng/m³)、環境大気を 24 時間通気させた場合の回収率は、91.6% (n=5、変動係数 7.6%) であった。本法で環境試料を分析した結果、神奈川県平塚市の大気からは、全検体で MDL 未満(<0.039 ng/m³)であった。以上の結果から、本法は大気試料中に含まれる 0.04 ng/m³ 程度の対象物質の検出に適用できると考えられる。

【参考文献】

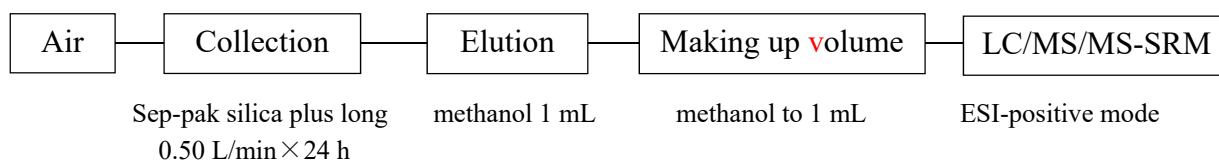
Gagné S, Carrier M, Aubin S, “Determination of triglycidyl isocyanurate from air samples by ultra-performance liquid chromatography coupled with coordination ion spray mass spectrometry” Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 913–918

【担当者連絡先】

所属先 : 神奈川県環境科学センター
所属先住所 : 〒254-0014 平塚市四之宮 1-3-39
TEL : 0463-24-3311 FAX : 0463-24-3300
担当者名 : 調査研究部 長谷川敦子
E-mail : hasegawa.j3i@pref.kanagawa.jp

**1,3,5-Tris(2,3-oxiranylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione
(1,3,5-Triglycidyl isocyanurate, TGIC)**

An analytical method is developed for the determination of TGIC in ambient air by solid phase collection followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in positive ESI (electrospray ionization) mode. SRM (selected reaction monitoring) chromatography of m/z 315 > 130 and m/z 315 > 82 are applied for quantification and identification. Sample air is drawn through a solid phase extraction tube of Sep-Pak Silica plus long (Waters, 690 mg) at a flow rate of 0.50 L/min for 24 h. The target compound is eluted from the tube with 1 mL of methanol, and is measured by LC/MS/MS-SRM. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.039 ng/m³ and 0.10 ng/m³, respectively. Recovery from ambient air was 91.6 % with relative standard deviation (RSD) of 7.6 %. Concentrations of TGIC in ambient air of Hiratsuka city were less than 0.039 ng/m³.



物質名	分析法フローチャート	備 考
1,3,5-トリス(2,3-エポキシプロピル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6 (1<i>H</i>,3<i>H</i>,5<i>H</i>)-トリオン IUPAC名 : 1,3,5-Tris(2,3-oxiranylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6 (1<i>H</i>,3<i>H</i>,5<i>H</i>)-trione 別名 : TGIC、イソシアヌル酸トリグリシジル、トリス (エポキシプロピル) イソシアヌラート	【大気】 <pre> graph LR A[大気] -- "Sep pak silica plus long 0.50 L/min × 24 h" --> B[捕集] B -- "メタノール 1 mL" --> C[溶出] C --> D[定容] D -- "メタノール 1 mL" --> E[LC/MS/MS-SRM] E --- F[ESI-positive mode] </pre>	分析原理 : LC/MS/MS-SRM ESI-Positive 検出下限値 : 【大気】 (ng/m³) 0.039 分析条件 : 機器 LC/MS : 島津製作所製 LCMS-8050 カラム Waters製 Cortecs C18+ (150 mm × 2.1 mm, 2.7μm)

ビス(*N,N*-ジメチルジチオカルバミン酸)*N,N'*-エチレン ビス(チオカルバモイルチオ亜鉛)

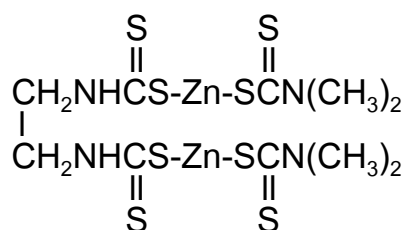
Bis (*N,N*-dimethyldithiocarbamate) *N,N'*-ethylenebis (thiocarbamoylthiozinc)

IUPAC 名：Dizinc bis(dimethyldithiocarbamate)ethylenebis(dithiocarbamate)

別名：ポリカーバメート

Polycarbamate

【対象物質の構造】

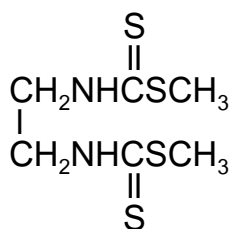


ポリカーバメート Polycarbamate

CAS 番号：64440-88-6

分子式：C₁₀H₁₈N₄S₈Zn₂

ポリカーバメートのメチル誘導体化物

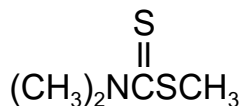


エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル
(EBDC-2Me)

CAS 番号：20721-48-6

分子式：C₆H₁₂N₂S₄

分子量：240.43



ジメチルジチオカルバミン酸メチル

(DMDC-Me)

CAS 番号：3735-92-0

分子式：C₄H₉NS₂

分子量：135.25

【物理化学的性状】

物質名	ポリカーバメート	EBDC-2Me	DMDC-Me
分子量	581.56	240.43	135.25
モライトビ [°] ック質量	577.79	239.99	135.02
形状	粉末 ¹⁾	粉末 ⁵⁾	粉末 ⁶⁾
色	白色 ¹⁾ (わずかにうすい黄褐色)	白色 ⁵⁾ (わずかにうすい黄褐色)	白色 ⁶⁾
比重 (g/cm ³)	1.73 ²⁾	-	-
融点 (°C)	-	107 ⁵⁾	43 - 47 ⁶⁾
沸点 (°C)	-	-	243 ⁶⁾
蒸気圧 (Pa)	1.53×10 ⁻¹⁰ ³⁾	-	-
水溶解度 (mg/L)	5.05 (20°C) ⁴⁾	-	-
密度 (g/m ³)	-	-	1.119 ⁷⁾
log P _{ow}	1.0 ²⁾	-	-

【毒性、用途】

〔毒性〕

- 急性毒性情報⁸⁾ : ラット（経口） LD₅₀ = 1761 mg/kg
ラット（経皮） LD₅₀ > 2000 mg/kg
ラット（吸入暴露） LC₅₀ = 0.104 mg/L（4時間換算）
有害性情報¹⁾ : 軽度の皮膚刺激性、強度の眼刺激性、in vitro復帰変異試験陽性

〔用途〕⁸⁾

殺菌剤、防かび剤、防汚剤

出典：

- 1) SDS 和光純薬工業 (2014)：ポリカーバメート標準品
- 2) 農薬時報別刷「農薬技術情報」14号（平成5年、農薬工業会）
- 3) 経済産業省：優先評価化学物質のリスク評価（一次）生態影響に係る評価Ⅱ 資料 2-3-1 物理化学的性状等の詳細資料 ビス（N,N-ジメチルジチオカルバミン酸）N,N'-エチレンビス（チオカルバモイルチオ亜鉛）（別名ポリカーバメート）（令和2年1月）(2020)
- 4) 日本植物防疫協会『農薬ハンドブック 2011年版』（2011）
- 5) SDS 和光純薬工業 (2014)：エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル標準品
- 6) SDS 和光純薬工業 (2014)：ジメチルジチオカルバミン酸メチル標準品
- 7) GuideChem
- 8) 日本植物防疫協会『農薬要覧 2011』（2011）

§1 分析法

(1) 分析法の概要

底質試料にメタノール及び 0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液を加え、振とうして対象物質を水溶性のナトリウム塩にする。遠心分離を行い、上澄み液に硫酸ジメチルを加えて激しく振とうして、メチル誘導体化を行う（注 1）。静置後、試料液を固相カートリッジに通水し、バックフラッシュによりアセトニトリルで溶出して LC/MS/MS で定量する。

なお、本分析法は、対象物質をエチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（EBDC-2Me）として測定し、ポリカーバメート換算として定量する。このため、誘導体化により EBDC-2Me を生成する化合物（マンゼブ及びマンネブなど）もポリカーバメートとして定量される。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ポリカーバメート	：富士フイルム和光純薬 残留農薬試験用 95.0～105.0%
エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル標準品(EBDC-2Me)	：富士フイルム和光純薬 残留農薬試験用 > 95%
ジメチルジチオカルバミン酸メチル標準品(DMDC-Me)	：富士フイルム和光純薬 残留農薬試験用 99.9%
アセトン	：富士フイルム和光純薬 残留農薬・PCB 分析用 300 倍濃縮
アセトニトリル	：関東化学製 LC/MS 用
メタノール	：関東化学製 LC/MS 用
精製水	：超純水（対象物質が含まれていないことを確認する）。本試験では、オルガノ PURELAB Ultra で精製したものを使用した。
L - システイン塩酸塩一水和物	：関東化学製 特級 > 99%
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na)	：同仁化学製 試験研究用
1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液	：富士フイルム和光純薬 高速液体クロマトグラフ用

水酸化ナトリウム	：富士フイルム和光純薬 特級
硫酸ジメチル	：富士フイルム和光純薬 一級
	本試薬は、シリカゲルを入れたデシケーター内で保管する（注2）。
6 mol/L 塩酸	：富士フイルム和光純薬 容量分析用
固相カートリッジ	：Waters 製 Oasis HLB Plus LP (60 μm, 225 mg)

【試薬の調製】

〔12 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液〕

水酸化ナトリウムを 48 g を量り採り、精製水で 100 mL に定容する。

〔5%(w/v)システイン - EDTA 溶液〕

システイン塩酸塩 50 g 及びエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ニナトリウム 50 g を量り採り、約 600 mL の精製水を加える。この懸濁液に、12 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をスターラーで攪拌しながら約 70 mL 加えることで、透明な溶液となる。これを精製水で 1 L に定容する。このとき溶液の pH は、約 10～11 となる。

〔0.5%(w/v)システイン - EDTA 溶液〕

5%(w/v)システイン - EDTA 溶液を 100 mL 量り取り、精製水で希釈して 1 L に定容する。

〔0.6 mol/L 塩酸〕

市販の 6 mol/L 塩酸を精製水で 10 倍希釈する。

【標準液の調製】

〔標準原液〕

ポリカーバメート 25.0 mg を正確に量り取り、0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液で 50 mL に溶解し、ポリカーバメートの 500 μg/mL 標準原液とする。

〔標準液〕

ポリカーバメートの 500 μg/mL 標準原液を 1.0 mL 分取し、0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液で 50 mL に希釈して、10 μg/mL 標準液を調製する。さらに、10 μg/mL 標準液を 5.0 mL 分取し、0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液で 50 mL に希釈して、1.0 μg/mL 標準液を調製する。さらに、1.0 μg/mL 標準液を 0.10 mL 分取し、0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液で 10 mL に希釈して、ポリカーバメートの 10

ng/mL 標準液を調製する。

〔ポリカーバメートメチル誘導体(EBDC-2Me 及び DMDC-Me)標準液〕

エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル(EBDC-2Me) 20.0 mg 及びジメチルジチオカルバミン酸メチル(DMDC-Me) 20.0 mg を正確に量り取り、メタノールで 20 mL に溶解し、1000 µg/mL 混合標準原液とする。

混合標準原液を 50 µL 分取し、メタノールで 50 mL に溶解し、1000 ng/mL 混合標準液とする。この溶液は用時調製とする（注 3）。

〔検量線用 EBDC-2Me 及び DMDC-Me 標準液〕

EBDC-2Me 及び DMDC-Me の 1000 ng/mL 標準液を 1 mL 分取し、メタノールで 10 mL に希釈して 100 ng/mL を調製する。順次希釈し、0.50～100 ng/mL までの検量線用標準液を作成する。この溶液は用時調製とする（注 3）。

【器具】（注 4）

自動固相抽出装置（GL サイエンス製 アクアトレース ASPE799 もしくはウォーターズ製 Sep-Pak コンセントレーター）、遠心分離機、遠沈管、メスフラスコ、蓋付ガラス試験管、マイクロシリンジ、パストゥールピペット、マイクロピペット及びガラス製先端チップ 等

(3) 分析法

【試料の採取及び採取試料の前処理】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従う。採取した底質試料は、概ね 3 日以内に試料の前処理及び試験液の調製を行うこと。

【試料の前処理及び試験液の調製】

湿重量 10 g 程度の底質試料にメタノール 35 mL 及び 0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液 40 mL を加え、10 分間振とうして対象物質を水溶性のナトリウム塩にして抽出を行う。振とう後、抽出液を遠心分離（2000 rpm、10 分間）して、上澄み液を採取する。残った底質に再びメタノール 35 mL 及び 0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液 40 mL を加え、10 分間振とうする。振とう後、遠心分離（2000 rpm、10 分間）を行い、上澄み液を採取し、先に採取した上澄み液に加える。上澄み液を 200 mL に定容してから、40 mL を分取して 0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液 160 mL を加える。これに硫酸ジメチル 100 µL を加えて軽く転倒した後、直ちに 0.6 mol/L 塩酸を 12 mL 程度加えて pH7.5～7.8 に調整し、10 分間激しく振とうしてメチル誘導体化を行う。このとき、溶液に濁りが生じた場合、2000 rpm

で 10 分間遠心分離を行って上澄み液を試料水とする。振とう後、直ちに試料水を固相カートリッジ(Oasis HLB) に 20 mL/min の速度で通水する。また、試料水を入れていた容器を精製水 50 mL で洗い込み、洗浄液を固相カートリッジに通水して洗浄し、吸引もしくは窒素気流下で 5 分間固相カートリッジを乾燥させる。乾燥後、バックフラッシュにより、アセトニトリル約 4.0 mL で溶出する。溶出液をアセトニトリルで 5.0 mL にメスアップして、試験液とする。溶出液に濁りが生じた場合、2000 rpm で 10 分間遠心分離を行って上澄み液を試験液とする。

【空試験液の調製】

0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液 200 mL を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項の硫酸ジメチルによる誘導体化以降の操作に従って、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS 条件〕

LC 条件

カラム : スペルコ製 Ascentis RP-Amide (10 cm × 2.1 mm , 3 μm)
移動相 : A : 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、B : メタノール
0 → 1.0 min A : 70 B : 30
1.0 → 10 min A : 70 → 0 B : 30 → 100 linear gradient
10 → 15 min A : 0 B : 100
15 → 24 min A : 0 → 70 B : 100 → 30 linear gradient
24 → 30 min A : 70 B : 30

カラム流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

試料注入液量 : 20 μL

MS 条件 (注 5)

コーンガス流量 : 50 L/hr
デソルベーションガス流量 : N₂ (700 L/hr)
ソース温度 : 110°C
デソルベーション温度 : 320°C

モニターイオン及び検出条件（注 6）

EBDC-2Me (ESI-Negative)

物質名	デュエル タイム (sec)	コーン 電圧 (V)	キャピラリー 電圧 (kV)	モニター イオン (m/z)	コリジョン 電圧(V)
EBDC-2Me	0.125	22	2.40	191 > 58	5.0

DMDC-Me (ESI-Positive)

物質名	デュエル タイム (sec)	コーン 電圧 (V)	キャピラリー 電圧 (kV)	モニター イオン (m/z)	コリジョン 電圧(V)
DMDC-Me	0.125	15	2.90	136 > 88	10

〔検量線〕

検量線用標準液 20 μ L を LC/MS/MS に注入して測定を行う。対象物質のピーク面積を検量線の縦軸、対象物質の濃度を横軸とし、最小二乗法により一次式の検量線を作成し、相関係数を計算する。

〔定量〕

試験液 20 μ L を LC/MS/MS に注入して測定を行う。得られたクロマトグラム上の対象物質のピーク面積を検量線に照らして、対象物質の試験液濃度(ng/mL)を求める。

〔濃度の算出〕

底質試料中の濃度 (ng/g-dry) = 検出濃度 (ng/mL) $\times$ 最終液量 (mL) / (1/5) / 試料量 (g-dry)

1/5：分取

〔換算（ポリカーバメート）〕

ポリカーバメート 1 分子より、EBDC-2Me が 1 分子及び DMDC-Me が 2 分子生成する。EBDC-2Me の全量がポリカーバメートに由来すると仮定した場合のポリカーバメート濃度換算値は以下のとおりになる。なお、誘導体化によりマンゼブ及びマンネブ等も EBDC-2Me を生成するため、試料中にこれらの物質を含む場合は合算した濃度となる。

【ポリカーバメート濃度】

= (【EBDC-2Me の濃度】 / 240.43) × 581.56

= 【EBDC-2Me の濃度】 × 2.419

〔装置検出限界(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す(注 7)。EBDC-2Me 0.25 ng/mL 標準液をポリカーバメートに濃度換算して IDL を算出した。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量* ¹ (g-wet)	分取* ²	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/g-dry)
ポリカーバメート	1.5	10	1/5	5.0	0.00063

*1: 乾燥試料 3 g-dry に相当 (水分 70%と仮定)

*2: 乾燥試料 0.6 g-dry に相当

〔分析方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 8)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (g-dry)	最終液量 (mL)	MDL (μg/g-dry)	MQL (μg/g-dry)
ポリカーバメート	0.630	5.0	0.00094	0.0026

注 解

(注 1) ポリカーバメートは、以下の誘導体化反応で EBDC-2Me 及び DMDC-Me を生成する。

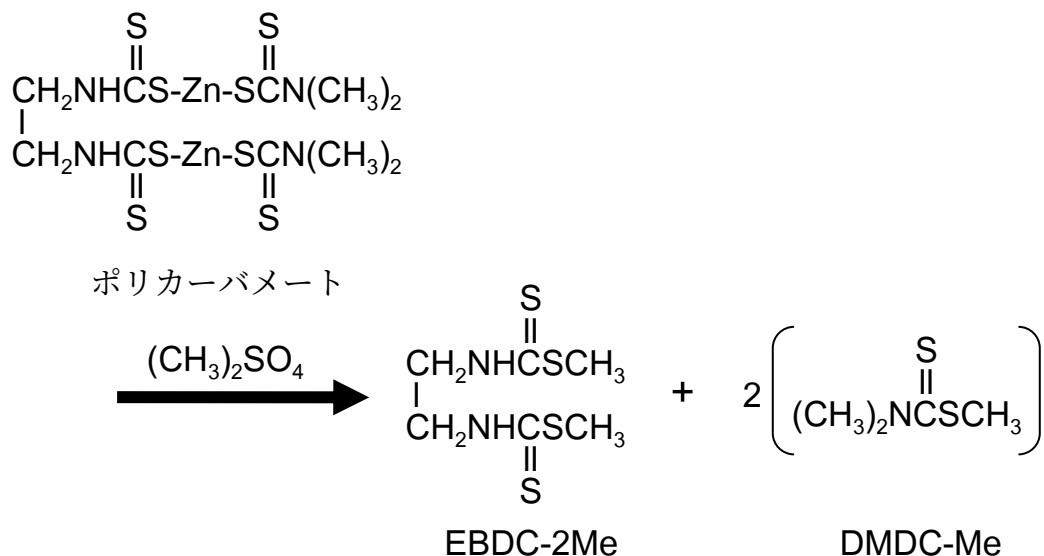


図 1 ポリカーバメートのメチル誘導体化反応

- (注 2) 通常の液色は、無色透明である。但し、開封後、そのまま保管すると、茶色に変色するため、デシケーター内で保管することで変色をある程度防止することができる。ジメチル硫酸は労働安全衛生法第 65 条の 2 第 2 項に基づく「作業環境評価基準」の管理濃度は、0.1ppm である。ドラフト内で扱い経気曝露を避けること。また、皮膚吸収性があるため、保護手袋などの保護具を着用すること。
- (注 3) 標準液は 3 日間程度経過すると損失が起こるため、用時調製すること。
- (注 4) マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注 5) 測定開始前に、サンプリングコーンをメタノールに浸漬して超音波洗浄を行うこと。洗浄が不十分の場合、EBDC-2Me の感度の著しい低下が見られる。
- (注 6) 本分析法では、EBDC-2Me を生成する化合物（マンゼブ及びマンネブなど）もポリカーバメートとして定量されるため、EBDC-2Me と DMDC-Me のモル濃度比からポリカーバメートであるか定性的な確認ができる。しかし、誘導体化により DMDC-Me を生成する化合物（ジラムなど）があること、また EBDC-2Me と DMDC-Me では環境中での挙動に違いがあることから、必ずしもモル濃度比だけで区別できない点に注意する。

(注 7) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 2 に示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

対象物質名	ポリカーバメート ^{*3}
試料量 (g-dry) ^{*1}	0.60
最終液量 (mL)	5.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.605
注入量 (pg)	12.1
装置注入量 (μL)	20
結果 1 (pg)	12.3
結果 2 (pg)	12.4
結果 3 (pg)	12.4
結果 4 (pg)	12.9
結果 5 (pg)	12.9
結果 6 (pg)	12.9
結果 7 (pg)	12.7
結果 8 (pg)	13.3
結果 9 (pg)	11.8
結果 10 (pg)	12.6
平均値(pg)	12.62
標準偏差(σ_{n-1})(pg)	0.418
IDL (pg) ^{*2}	1.5
IDL 試料換算値 (ng/g-dry)	0.63
S/N 比	10
CV (%)	3.2

*1: 湿泥 10 g (水分 70%と仮定) を 1/5 分取した量に相当

*2: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*3: 【ポリカーバメート濃度(ng/mL)】
= 【EBDC-2Me 濃度(ng/mL)】 × 2.419

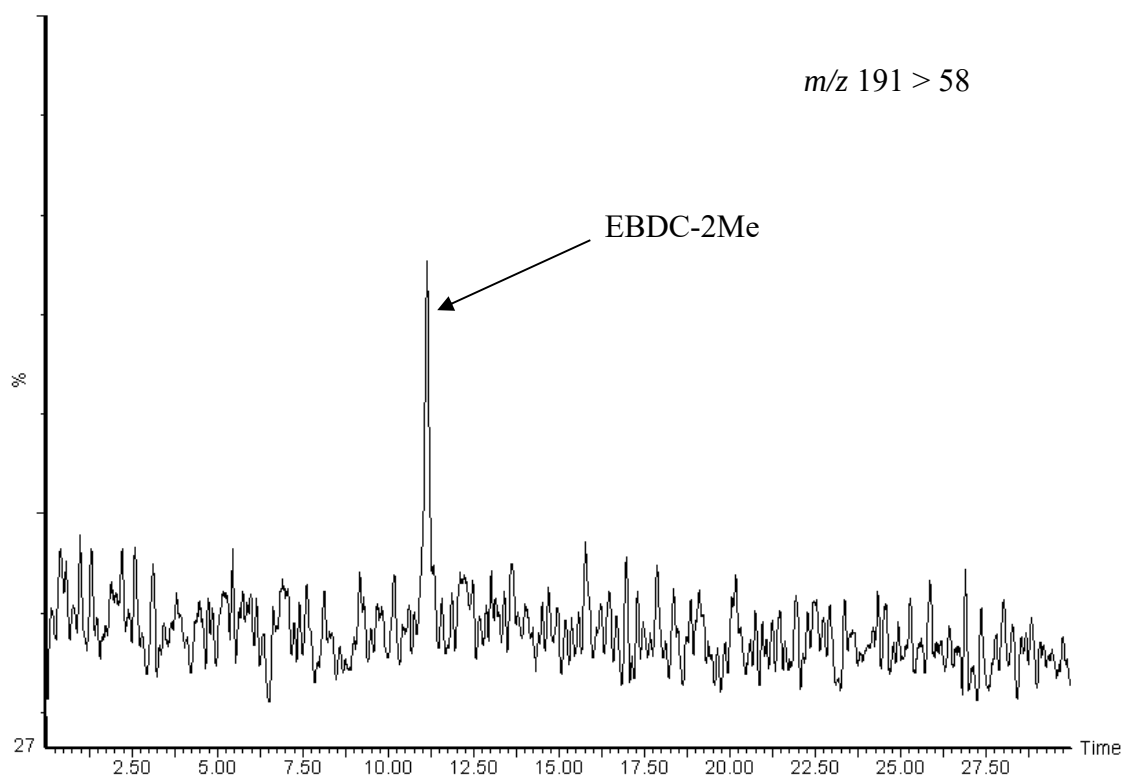


図 2 IDL 測定時のクロマトグラム〔EBDC-2Me、濃度：0.25 ng/mL（ポリカーボネート 0.605 ng/mL に相当）〕

(注 8) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 27 年度版）」（平成 28 年 3 月）に従って、表 4 のとおり算出した。また、MDL 測定時のクロマトグラムを図 3 に示す。MDL 測定は、底質への標準添加後、直ちに試験を行った。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果（詳細）

対象物質名	ポリカーバメート		回収率 (%)
	名古屋市	荒子川	
試料		底質	
試料量(g-dry) ^{*1}	0.630		—
標準添加量(ng)	10		—
試料換算濃度(ng/g-dry)	15.9		—
最終液量(mL)	5.0		—
装置注入量(μL)	20		—
操作ブランク平均(ng/g-dry) ^{*2}	< 0.94		—
無添加試料(ng/g-dry) ^{*3}	< 0.94		—
結果 1 (ng/g-dry)	12.4		78
結果 2 (ng/g-dry)	12.1		76
結果 3 (ng/g-dry)	11.9		75
結果 4 (ng/g-dry)	12.4		78
結果 5 (ng/g-dry)	12.1		76
結果 6 (ng/g-dry)	12.5		79
結果 7 (ng/g-dry)	12.7		80
結果 8 (ng/g-dry)	12.4		78
結果 9 (ng/g-dry)	12.6		79
結果 10 (ng/g-dry)	12.4		78
平均値(ng/g-dry)	12.35		77.8
標準偏差(ng/g-dry)	0.257		
MDL(ng/g-dry) ^{*5}	0.94		
MQL(ng/g-dry) ^{*6}	2.6		
S/N 比	27		
CV (%)	2.1		

*1：湿泥 10 g（水分 68.5%）を 1/5 分取した量に相当

*2：空試験液を測定した値の平均値 (n = 2)

*3：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n = 1)

*4：MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

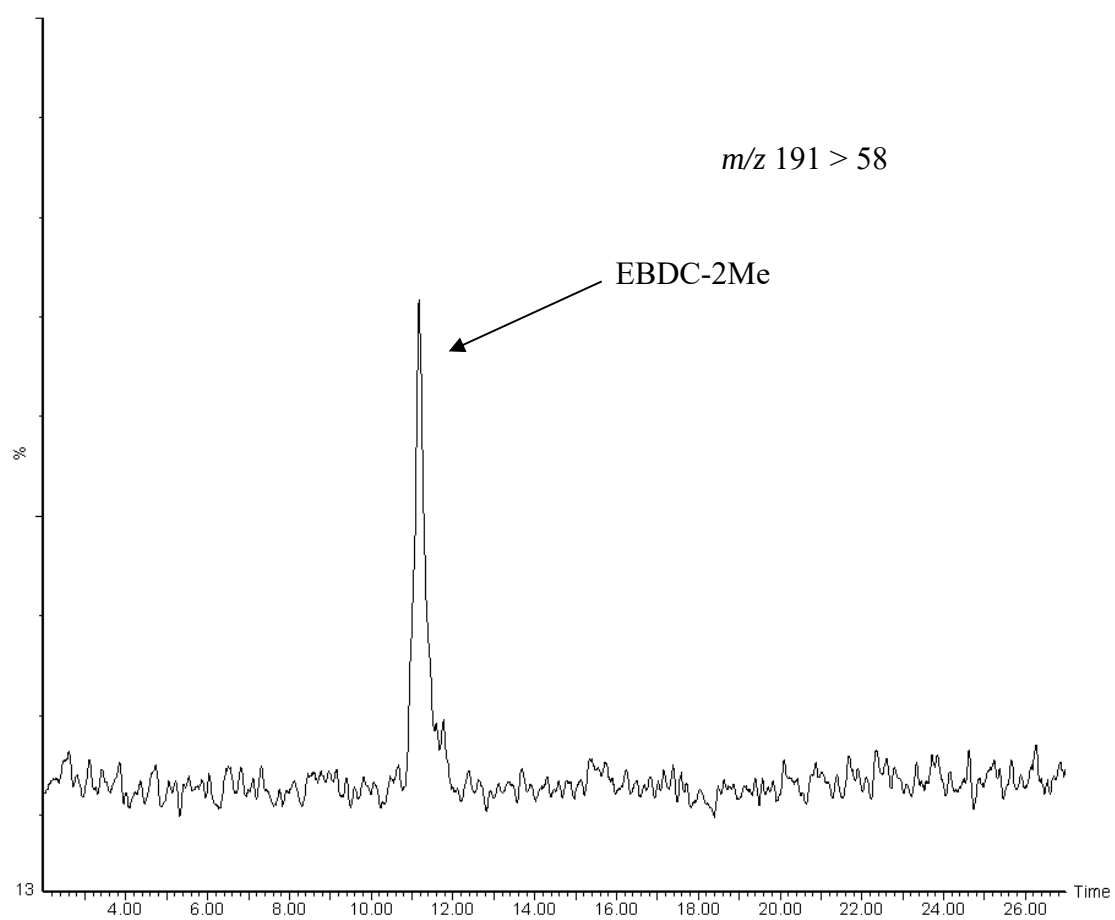


図3 MDL 測定時のクロマトグラム (ポリカーバメート)

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図4に示す。

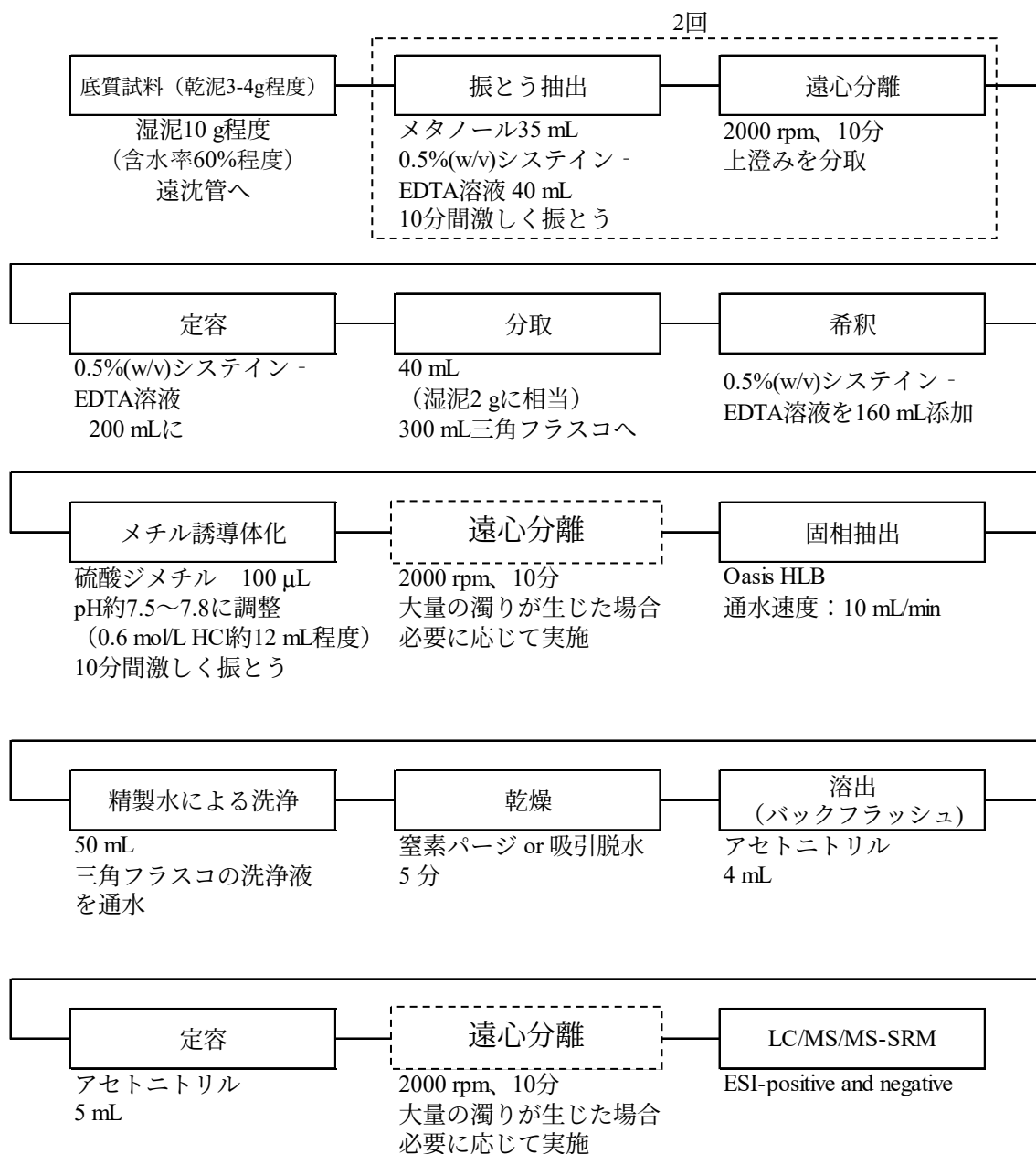


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

ポリカーバメートのメチル誘導体である EBDC-2Me の検量線を図 5、検量線作成用データを表 5 に示す。

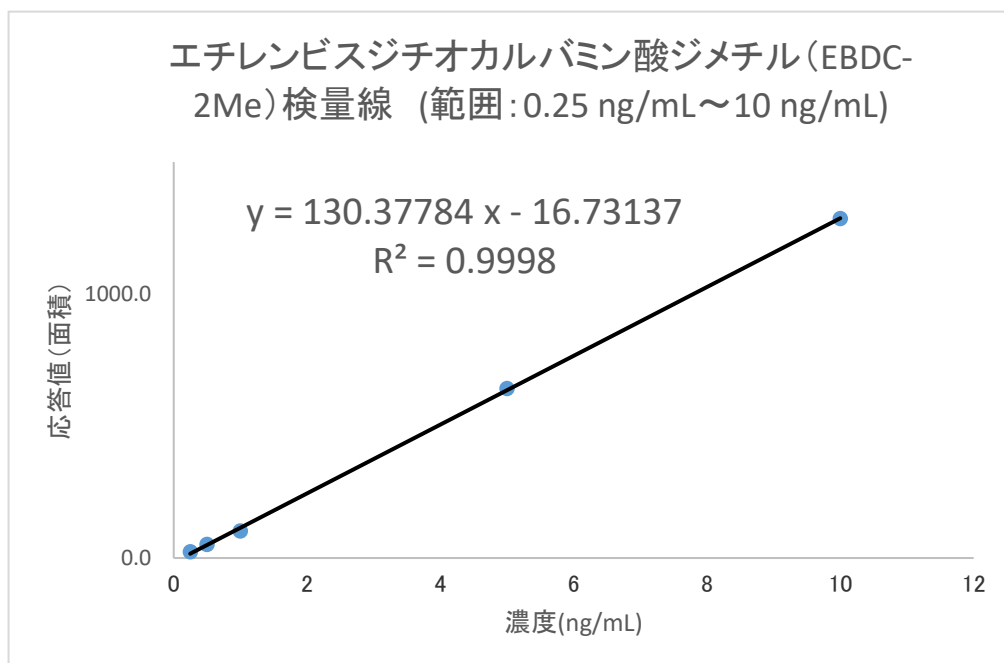
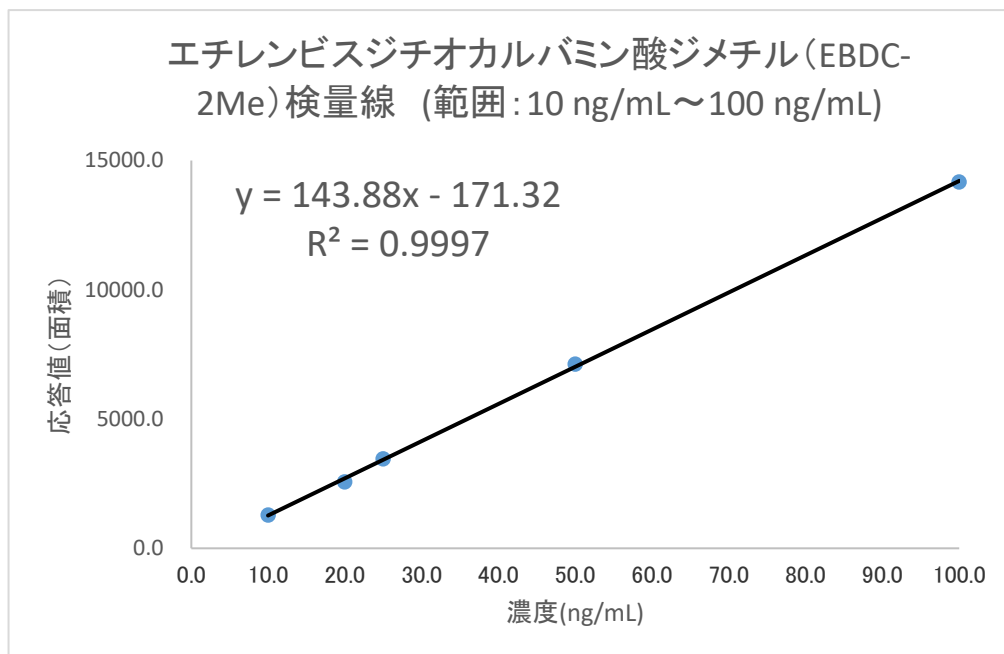


図 5 EBDC-2Me の検量線

上図：高濃度検量線(10 ng/mL ~ 100 ng/mL)

下図：低濃度検量線(0.25 ng/mL ~ 10 ng/mL)

表 5 EBDC-2Me の検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	応答値
	対象物質(As)
	【EBDC-2Me】 (m/z 191 > 58)
0.25	22.4
0.50	49.9
1.0	101.6
5.0	641.5
10	1284.9
20	2581.3
25	3463.8
50	7134.0
100	14174.6

〔クロマトグラム〕

EBDC-2Me 標準液のクロマトグラムを図 6 に示す。

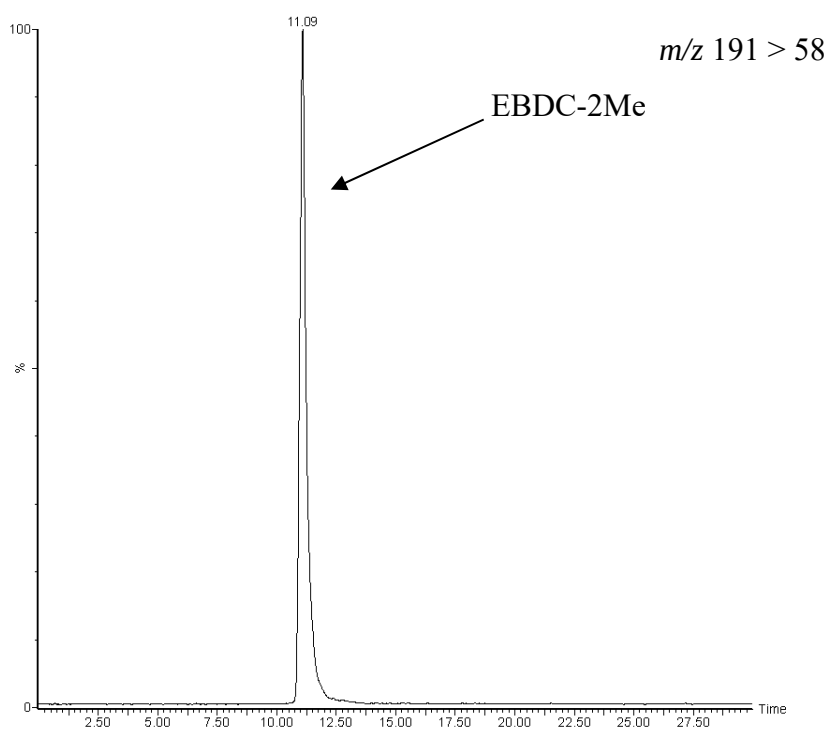


図 6 EBDC-2Me 標準液のクロマトグラム(100 ng/mL)

[マススペクトル]

EBDC-2Me のマススペクトルを図 7 に示す。

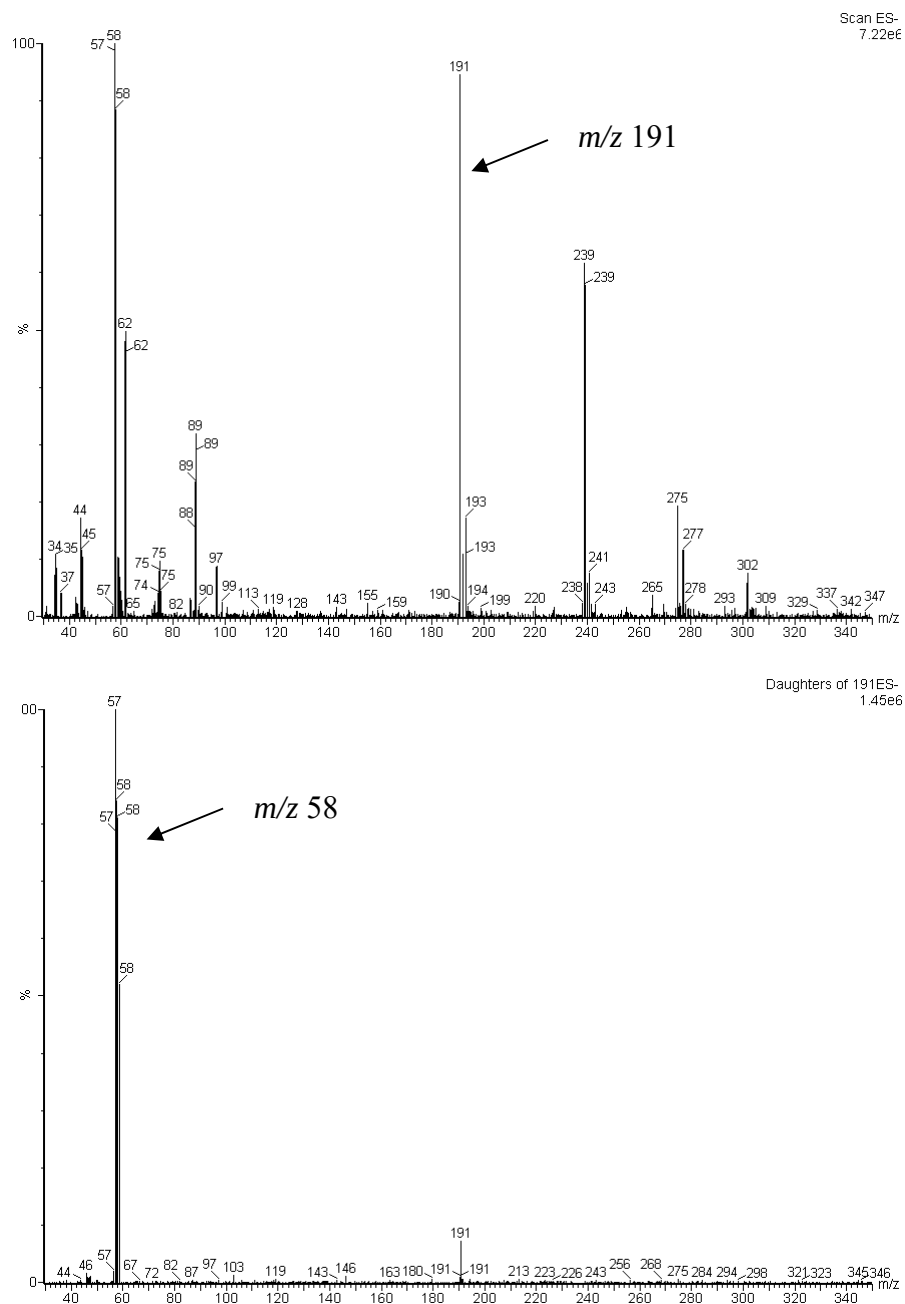


図 7 EBDC-2Me のマススペクトル及びプレカーサー m/z 191 に対するプロダクトイオン (ESI ネガティブ)

〔操作ブランク試験〕

ポリカーバメートの操作ブランクは MDL 未満であった。クロマトグラムを図 8 に示す。

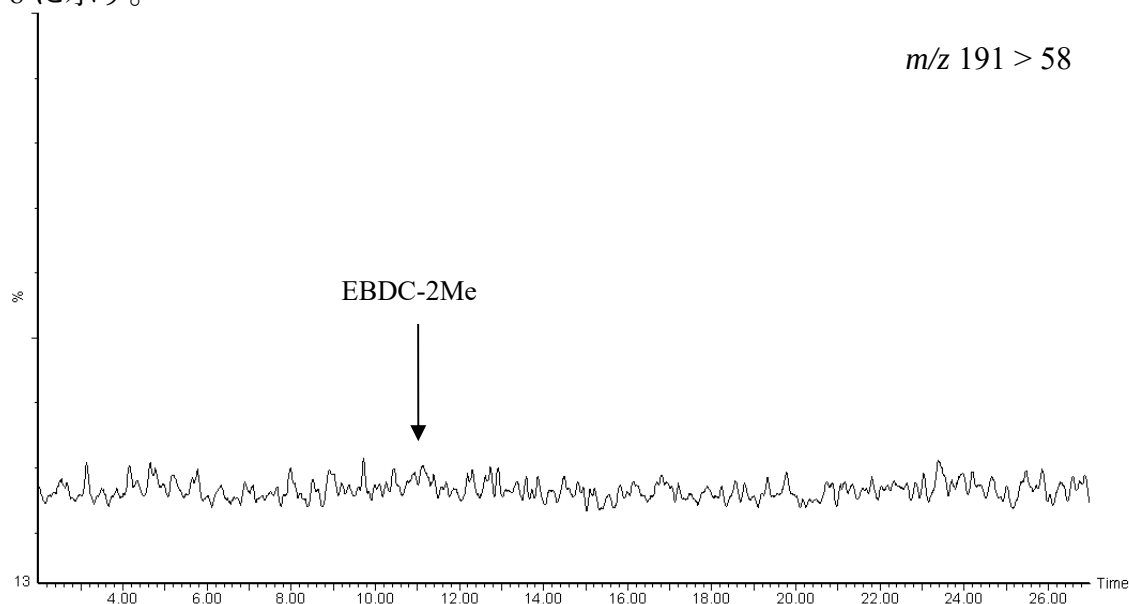


図 8 ポリカーバメートの操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

底質へのポリカーバメートの添加回収試験結果を表 4 に示す。添加回収率は、およそ 78%であった。

〔保存性試験〕

MDL 試験時において、底質試料へのポリカーバメート標準液を添加し、直ちに抽出を行った。なお、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）第 4 章「分析法開発」における「標準溶液を添加して十分に混合し、原則として室温で一晩放置後、前処理操作を行う。」の記載に従って室温で一晩放置した場合は、全く回収率が得られなかった。さらに、冷暗所で一晩保存した場合でも同様の結果であった。また、標準添加と同時にメタノール 35 mL 及び 0.5%(w/v)システイン-EDTA 溶液 40 mL を添加して冷暗所で一晩保存した結果を表 6 に示す。事前にメタノールを添加しないと翌日にメタノールを添加して抽出しても全く回収されなかった。一方、事前にメタノールを添加することで 2 日目までで残存率が約 50%程度となった。

表 6 保存性試験結果（試料）

試料	試験 数	調製濃度 (ng/g-dry)	メタノール 添加	検出濃度(ng/g-dry)（残存率(%) [*] ）		
				0 日間	1 日間	2 日間
底質（荒子川	2	15.8	無添加	12.3 (78)	0 (0)	-
ポンプ所）	2	15.8	添加	12.3 (78)	8.32 (53)	7.07 (46)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

底質に標準液を添加して、【試料の採取及び採取試料の前処理】に従ってメタノール及び0.5%(w/v)シス테인-EDTA 溶液を添加して得た粗抽出液の保存性の試験をおこなった（保存容器はガラス瓶、4℃ の冷暗所で保存）。その結果を表 7 に示す。概ね 3 日程度まで 70%程度保存することができていたことがわかった。

表 7 保存性試験結果（粗抽出液）

試料	試験 数	調製濃度 (ng/g-dry)	検出濃度(ng/g-dry)（残存率(%) [*] ）							
			0 日間	1 日間	2 日間	3 日間	4 日間	5 日間	6 日間	7 日間
底質（荒子川	2	15.8	12.3 (78)	11.5	11.6	10.7	6.20	5.20	3.56	0
ポンプ所）				(73)	(73)	(68)	(39)	(33)	(23)	(0)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔誘導体化の効率と濃度の比較〕

本法が適用している濃度範囲において、濃度の多寡による硫酸ジメチルの誘導体化効率に差異が無いか確認するため、低濃度域から高濃度域のポリカーバメートを添加した 0.5%(w/v)シス테인-EDTA 溶液 200 mL を【試料の前処理及び試験液の調製】に従って誘導体化し、EBDC-2Me 標準液を用いた検量線により定量を行った。その結果を表 8 に示す。また、その際に調製したポリカーバメート濃度とその応答値（面積）との相関を図 9 に示す。ポリカーバメートの濃度が 0.050～7.5 ng/mL の範囲においては、誘導体化の差異はほとんど無く、概ね 70%以上の回収率であった。また、図 9 から、相関係数が 0.9995 を示しており、水溶液濃度と応答値の強い相関が認められた。さらに、このとき同時に得られた DMDC-Me の検出濃度から EBDC-2Me と DMDC-Me のモル濃度比を表 9 に示す。通常ならば、EBDC-2Me と DMDC-Me のモル濃度比は、0.5 になるはずである。表 9 から、モル濃度比は、0.50～0.52 の範囲に収まっていた。

表 8 ポリカーバメートの誘導体化効率と濃度の比較

ポリカーバメート 標準水溶液濃度 (ng/mL)	EBDC-2Me			回収率 (%)
	応答値	実測濃度 (ng/mL)	ポリカーバメート 換算水溶液濃度 (ng/mL)	
2.0	66.5	0.699	1.69	84.5
10	319.5	3.286	7.95	79.5
20	647.6	6.368	15.41	77.0
40	1202.2	13.529	32.73	81.8
200	4999.3	65.050	157.36	78.7
300	7002.8	92.235	223.12	74.4

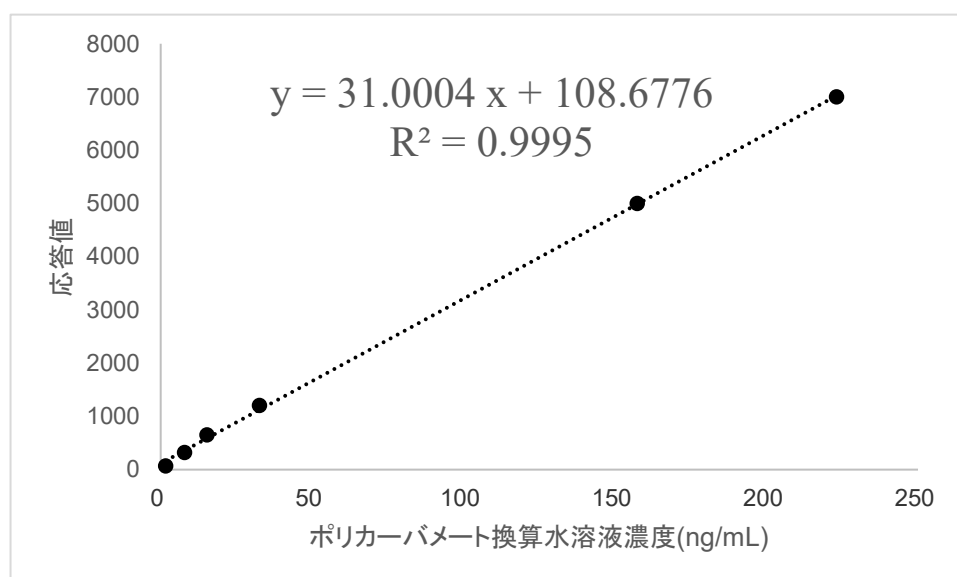


図 9 ポリカーバメート水溶液濃度と応答値との相関

表9 EBDC-2Me と DMDC-Me のモル濃度比

ポリカーバメート 標準水溶液濃度 (ng/mL)	EBDC-2Me		DMDC-Me		EBDC-2Me /DMDC-Me モル濃度比
	実測濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	実測濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	
2.0	0.70	85	-	-	-
10	3.29	79	-	-	-
20	6.37	77	-	-	-
40	13.53	82	14.9	80	0.511
200	65.05	79	73.1	78	0.501
300	92.24	74	99.9	71	0.519

〔環境試料の分析例〕

本法を用いて、図 10 に示した河川 8 地点(No.1～8)及び名古屋港 3 地点(No.9～11)から採取した底質について、ポリカーバメートの測定を行った。このとき、港新橋の底質から得られたクロマトグラムを図 11 に示す。いずれの地点においてもポリカーバメートに由来するピークは観測されなかった。

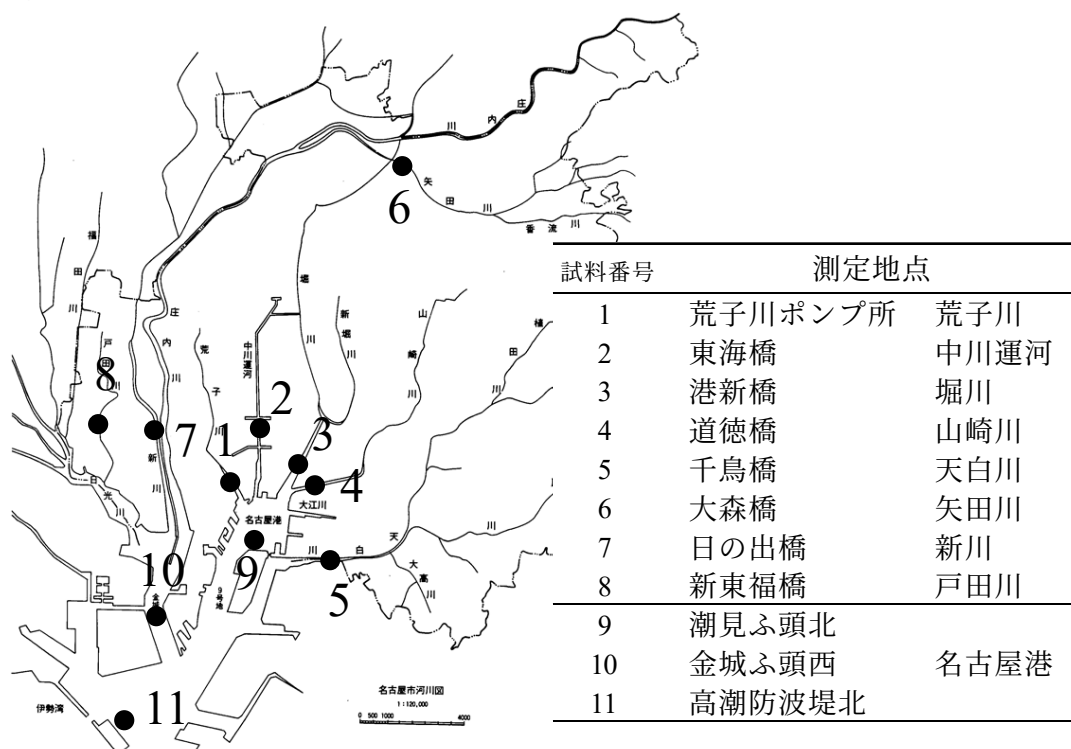


図 10 環境試料の測定地点

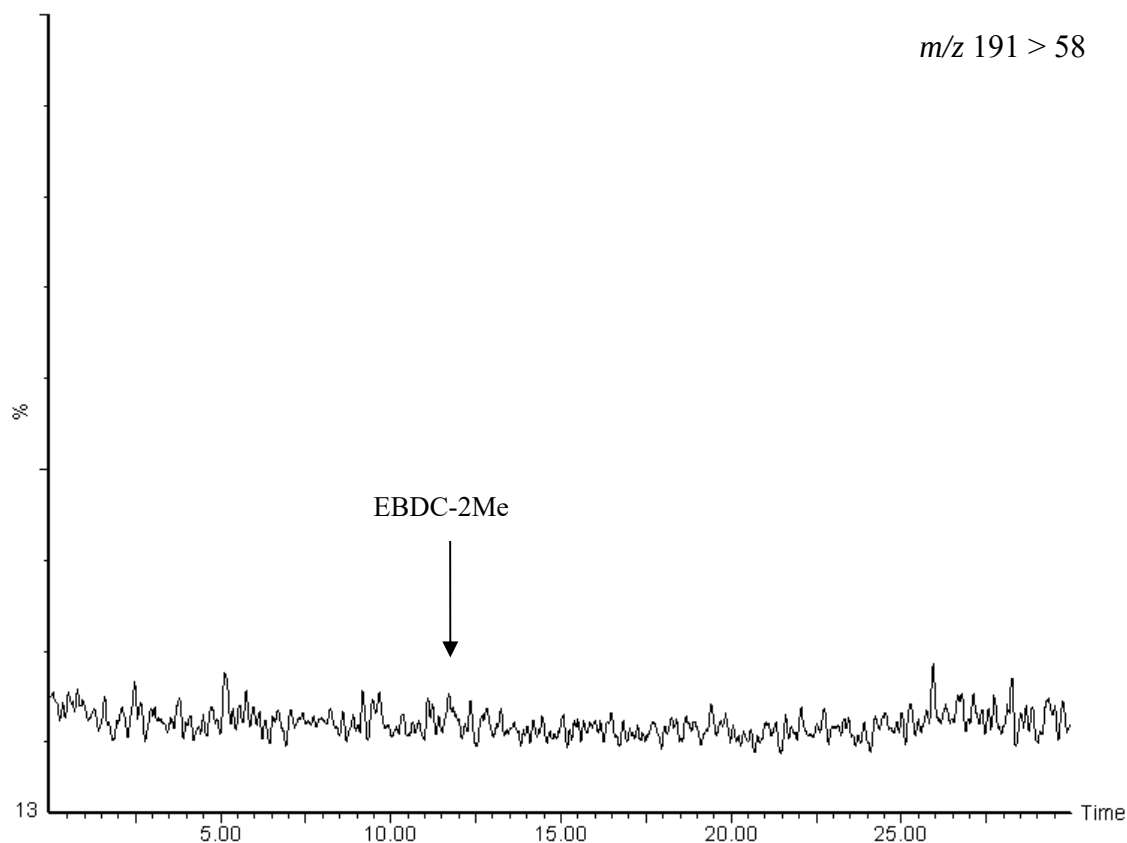


図 11 環境試料（港新橋）のクロマトグラム

【評価】

本法におけるポリカーバメートの MDL 及び MQL は、0.94 ng/g-dry および 2.6 ng/g-dry であった。また、河川及び海域から採取された底質からポリカーバメートは検出されなかった。底質にポリカーバメートを 10 ng 添加した際の回収率は、概ね 78% であった。

以上の結果から、本法は環境底質中の 1.0 ng/g-dry オーダーのポリカーバメートの検出に適用できるものと判断される。

【参考文献】

- 1) 平成 17 年度化学物質分析法開発調査（その 3）：マンコゼブ、マネブ、ジラム、ポリカーバメート，456 - 470，環境省環境保健部環境安全課（平成 18 年 7 月）
- 2) 平成 17 年度化学物質分析法開発調査（その 3）：マネブ、ポリカーバメート，471 - 489，環境省環境保健部環境安全課（平成 18 年 7 月）
- 3) 平成 17 年度化学物質分析法開発調査（その 3）：マネブ、ポリカーバメート，490 - 506，環境省環境保健部環境安全課（平成 18 年 7 月）

- 4) 巴山 忠：LC-MS/MSによる環境負荷化学物質の分析に関する研究，福岡大学薬学集報/Pharmaceutical Bulletin of Fukuoka University, 8, 84-99 (2008)
- 5) 木下 輝昭，小杉 有希，鈴木 俊也，保坂 三継，栗田 雅行：硫酸ジメチル誘導体化-LC/MS/MSによる水道水中のジチオカルバメート系農薬類の分析法の検討，東京健安研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 66, 261-266, (2015)
- 6) 高木総吉，吉田 仁，小泉義彦，安達史恵，中島孝江，田中栄次，足立伸一：誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法を用いた水道原水および水道水中ジチオカルバメート系農薬の定量，環境化学 *Journal of Environmental Chemistry*, Vol.26, No.3, 141-147 (2016)
- 7) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（厚生労働省 平成17年 1月24日付け食安発第0124001号通知）：ジチオカルバメート試験法（農産物及び畜水産物）
- 8) 平成24年度漁場環境・生物多様性評価手法等開発事業（代替防汚剤環境影響評価調査）：化学物質の環境中濃度予測
- 9) 東京有機化学工業(株)農薬技術センター：ポリカーバメートの毒性試験の概要，農薬時報別冊「農薬技術情報」，14号，14-18 (1993)

【担当者連絡先】

所属先名称：名古屋市環境科学調査センター

所属先住所：名古屋市南区豊田 5-16-8

TEL：052-692-8481 FAX：052-692-8483

担当者名：平生進吾、長谷川瞳、山守英朋

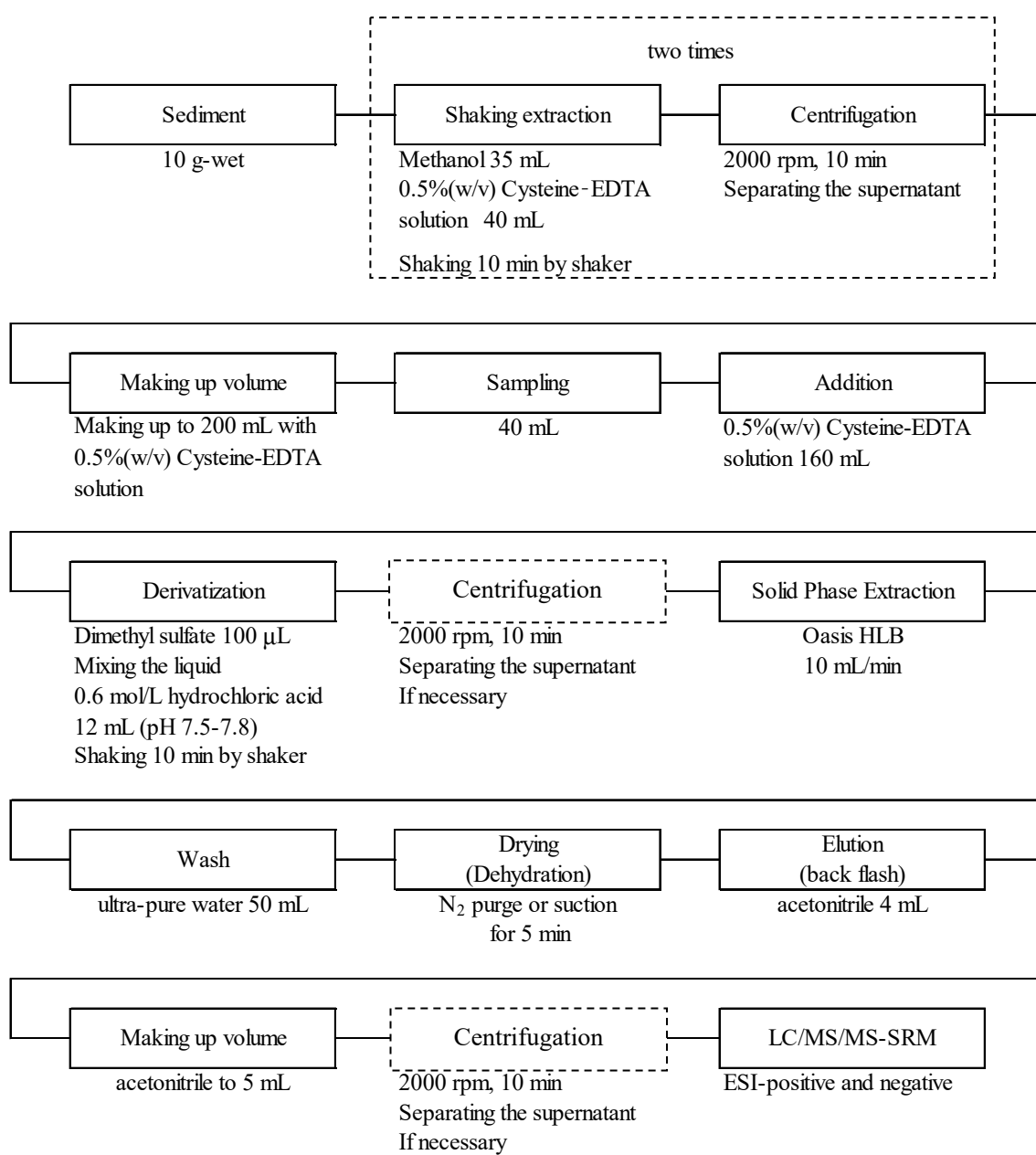
E-mail：hirao@ncies.net、hitomi@ncies.net、yamamori@ncies.net

**Bis (*N,N*-dimethyldithiocarbamate) *N,N'*-ethylenebis (thiocarbamoylthiozinc)
(Polycarbamate)**

This method provides a procedure for the determination of polycarbamate in sediment samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

Thirty-five mL of methanol and 40 mL of 0.5%(w/v) cysteine-EDTA solution are added to 10 g-wet of sediment sample for the purpose of being the alkali decomposition of polycarbamate. The sediment sample is shaken for 10 minutes by shaker, and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. These treatments are repeated two times, and separated supernatants are mixed. The Separated supernatant sample is made up to 200 mL with 0.5%(w/v) cysteine-EDTA solution. The sample is separated 40 mL from 200 mL, and added to 0.5%(w/v) cysteine-EDTA solution of 160 mL. For methylation, 100 μ L of dimethyl sulfate is added to the sample and the pH is adjusted between 7.5 and 7.8 by addition of 12 mL of 0.6 mol/L hydrochloric acid immediately. The sample is shaken by shaker for 10 minutes. At this time, polycarbamate is methylated to ethylenebis dithiocarbamate dimethyl (EBDC-2Me) and dimethyldithiocarbamate methyl (DMDC-Me). These analytes are extracted by passing the sample solution through Oasis HLB plus cartridge at flow rate of 20 ml/min. After extraction, the cartridge is rinsed with 10 mL ultra-pure water. After the cartridge is dehydrated for 5 minutes with N₂ purge or suction, the analytes are back-eluted from the cartridge with 4 mL of acetonitrile. The final volume is made up to 5 mL with acetonitrile, and the solution are analyzed by LC/MS/MS. Concentrations of polycarbamate are calculated from EBDC-2Me.

The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) is 0.94 and 2.6 ng/g-dry. The mean recoveries in river sediment samples were 78% for polycarbamate. This analytes in the river and sea sediment sampled at Nagoya city were not detected.



物質名	分析法フローチャート	備考
ビス(<i>N,N</i> -ジメチルジチオカルバミン酸) <i>N,N'</i> -エチレンビス(チオカルバモイルチオ亜鉛) IUPAC 名 : Dizinc bis(dimethyldithiocarbamate) ethylenebis(dithiocarbamate) 別名 : ポリカーバメート	【底質】 <pre> graph LR A[底質試料 (乾泥3-4g程度) 湿泥10 g程度 (含水率60%程度) 遠沈管へ] --> B[振とう抽出 メタノール35 mL 0.5%(w/v)システイン - EDTA溶液 40 mL 10分間激しく振とう] B -- 2回 --> C[遠心分離 2000 rpm、10分 上澄みを分取] C --> D[定容 0.5%(w/v)システイン - EDTA溶液 200 mLに] D --> E[分取 40 mL (湿泥2 gに相当) 300 mL三角フラスコへ] E --> F[希釈 0.5%(w/v)システイン - EDTA溶液を160 mL添加] F --> G[メチル誘導体化 硫酸ジメチル 100 μL pH約7.5~7.8に調整 (0.6 mol/L HCl約12 mL程度) 10分間激しく振とう] G --> H[遠心分離 2000 rpm、10分 大量の濁りが生じた場合 必要に応じて実施] H --> I[固相抽出 Oasis HLB 通水速度 : 10 mL/min] I --> J[精製水による洗浄 50 mL 三角フラスコの洗浄液 を通水] J --> K[乾燥 窒素パージ or 吸引脱水 5 分] K --> L[溶出 (バックフラッシュ) アセトニトリル 4 mL] L --> M[定容 アセトニトリル 5 mL] M --> N[遠心分離 2000 rpm、10分 大量の濁りが生じた場合 必要に応じて実施] N --> O[LC/MS/MS-SRM ESI-positive and negative] </pre>	分析原理 LC/MS/MS-SRM ESI-negative ESI-positive 検出下限値 【底質】 (ng/g-dry) 0.94 ng/g-dry 分析条件 : 機器 LC : Waters 製 Alliance2695 MS : Waters 製 Quattromicro API LC カラム スペルコ製 Ascentis RP-Amide 10 cm × 2.1 mm, 3 μm

ヘキサクロロエタン

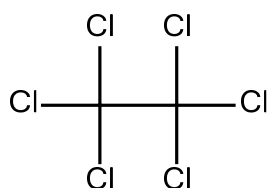
Hexachloroethane

別名：ペルクロロエタン、1,1,1,2,2,2-クロロエタン、六塩化エタン

ヘキサクロロシクロペンタジエン

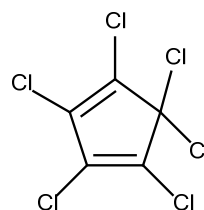
Hexachlorocyclopentadiene

【対象物質の構造】



CAS 番号：67-72-1

分子式：C₂Cl₆



CAS 番号：77-47-4

分子式：C₅Cl₆

【物理化学的性状】

物質名	ヘキサクロロエタン	ヘキサクロロシクロペンタジエン	出典
分子量	236.74	272.77	1)
モライイトビッ質量	233.8131	269.8131	-
融点	184°C	-11.34°C	2)
沸点	186°C (昇華する)	239°C	1)
比重	2.091g/cm ³ (25°C)	1.710 g/cm ³ (20°C)	1)
蒸気圧	53 Pa (25°C)	10.7 Pa (25°C)	1)
水溶解度	0.05 g/L	1.03～1.25 mg/L	1)
log P _{ow}	3.9 (実測値)	5.04 (測定値)	2)

【毒性、用途】

物質名		毒性(mg/kg) ¹⁾		用途 ¹⁾
ヘキサクロロエタン	ラット	経口 LD ₅₀	4460	発煙剤、アル
	ラット	経口 LD ₅₀	5900	ミ 鋳 物 脱 ガ
	ラット	経口 LD ₅₀	6000	ス、脱酸剤用、
	ウサギ	経皮 LD ₅₀	32000	塩ビ可塑助剤
ヘキサクロロシクロ ペンタジエン	ラット	経口 LD ₅₀	315 (♀)	農薬中間体
	ラット	経口 LD ₅₀	425 (♂)	
	ウサギ	経皮 LD ₅₀	340 (♀)	

出典

- 1) 独立行政法人製品評価技術基盤機構:化学物質総合情報提供システム(CHRIP)
- 2) U.S. National Center for Biotechnology Information's PubChem system

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料に塩化ナトリウムを添加し、ジクロロメタンで振とう抽出する。ジクロロメタン層を脱水、濃縮後、ヘキサン転溶する。シリカゲルカートリッジで精製し、シリンジスパイク内標準（以下、「内標準」という）を添加してGC/MS-SIM 法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】（注 1）

ヘキサクロロエタン	: AccuStandard 製（純度 99.8 %）（100 µg/mL、メタノール溶液）
ヘキサクロロシクロ ペンタジエン	: LGC Labor Gmb 製（純度 99.0 %）（100 µg/mL、イソオクタン溶液）
ナフタレン- <i>d</i> ₈	: 富士フィルム和光純薬製 環境分析用（純度 98 %）
<i>p</i> -ブロモフルオロベンゼン- フルオロベンゼン混合標準液	: 富士フィルム和光純薬工業製 水質試験用（各 1 mg/mL、メタノール）（注 2）
ジクロロメタン	: 富士フィルム和光純薬製 残留農薬試験・PCB 試験用

硫酸ナトリウム（無水）	: 関東化学製 残留農薬試験・PCB 試験用
ヘキサン	: 関東化学製 残留農薬試験・PCB 試験用
シリカカートリッジ	: SUPELCO 製 Supelclean LC-Si Glass Tubes (充填量: 500 mg 粒子径: 45 μ m 容: 6 mL)
精製水	: Milli-Q 水

【標準液の調製】

〔標準原液〕

市販のヘキサクロロエタン（100 μ g/mL、メタノール溶液）及びヘキサクロロシクロペンタジエン（100 μ g/mL、イソオクタン溶液）を標準原液とする。

〔内標準液〕

内標準物質（ナフタレン- d_8 ）を正確に 10.0 mg 量り取り、ヘキサンで 10 mL として 1000 μ g/mL の内標準原液を調製する。これをヘキサンで正確に希釈し、10 μ g/mL の内標準液を調製する。

p-ブロモフルオロベンゼン-フルオロベンゼン混合標準液(1 mg/mL)をヘキサンで希釈し、10 μ g/mL の内標準液を調製する。

〔検量線用標準液〕

標準原液をヘキサンで順次希釈し、0.50～100 ng/mL の濃度範囲の検量線用標準液を作製する。各濃度の検量線用標準液に、内標準物質の濃度が 100 ng/mL となるように内標準液を添加する。

【器具】（注 3）（注 4）

ロータリーエバポレータ、振とう器、窒素濃縮装置、ホールピペット、メスシリンダー、メスフラスコ、マイクロシリンジ

ガラス器具は、洗剤で洗浄、精製水ですすぎ乾燥後、さらにアセトン、ヘキサンで洗浄して乾燥させる。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従う。なお、直ちに分析できない場合は、pH5 になるようアスコルビン酸を添加（目安として河川水 1 L に対して約 0.9 g、海水 1 L に対して約 1.3 g）し、汚染のない冷暗所（10 $^{\circ}$ C 以下）で凍結しないように保存する。

【試料の前処理】

水質試料 1 L を分液漏斗に量り取り、塩化ナトリウム 30 g (海水試料には添加しない) を加え、ジクロロメタンで 2 回 (1 回目 : 100 mL 2 回目 : 50 mL、各 10 分) 液々抽出を行う。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレータ (750 hPa、37 °C) で 2~3 mL まで減圧濃縮後、ヘキサン 2~3 mL を加えてさらに 2~3 mL まで減圧濃縮する。その後、緩やかな窒素気流下で 1 mL まで濃縮し、粗抽出液とする。あらかじめヘキサン 5 mL でコンディショニングしたシリカカートリッジに、粗抽出液を負荷する。ヘキサン 5 mL を流して溶出し、窒素気流下で 1 mL に濃縮・定容する。その後、10 µg/mL の内標準液を 10 µL 添加して試験液とする。

【空試験液の調製】

試料水と同量の水 (Milli-Q 水) を用い、【試料の前処理】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔GC/MS 条件〕

機種	: GC ; Agilent 製 6890N、MS ; Agilent 製 5975C	
カラム	: Agilent 製 HP-5MS UI (30 m×0.25 mm, 0.25 µm)	
カラム温度	: 40 °C (1 min)→10°C /min→280°C (10 min)	
注入口温度	: 240 °C	
注入方法	: スプリットレス、パージ開始時間 1.0 min	
キャリアガス	: He (0.9 mL/min)	
イオン源温度	: 250 °C	
イオン化電流	: 40 µA	
イオン化電圧	: 70 eV	
測定モード	: SIM	
モニターイオン	: ヘキサクロロエタン	: m/z 200.80 (定量用)
		: m/z 202.90 (確認用)
		: m/z 198.80 (確認用)
	: ヘキサクロロシクロ	: m/z 236.80 (定量用)
	ペンタジエン	: m/z 238.80 (確認用)
	: ナフタレン-d ₈	: m/z 136.10 (定量用)
	: p-ブロモフルオロベンゼン	: m/z 173.90 (定量用)

2021(R3)調査において、環境試料分析時に内標準に干渉があったと記載があることから、分析担当機関が測定モードをSIMモードからSRMモード(ヘキサクロロシクロペンタジエンが m/z 237> 143(定量)、237>119(確認)、ナフタレン-d₈が m/z 136 > 108 (定量)、p-ブロモフルオロベンゼン m/z 174 > 95 (定量))に変更し、測定したと報告があった。内標準は妨害がなく、良好な結果であった。(2022(R4)精査等検討会コメント)

〔検量線〕

検量線用標準液 1 μL を GC/MS に注入し、対象物質と内標準物質の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線により定量する。

〔定量〕

試験液 1 μL を GC/MS に注入し、得られた対象物質と内標準物質のピーク面積の比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度 C ($\mu\text{g/L}$) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q/V$$

R : 検量線から求めた内標準物質濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料に添加した内標準物質の量 (μg)

(添加した内標準液の濃度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $\times$ 添加した内標準液の容量(μL))

V : 試料量(L)

本法に従った場合、次の数値を使用する。

$$Q = 0.10 (\mu\text{g})$$

(= 添加した内標準液の濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) $\times$ 添加した内標準液の容量 (0.01 mL))

$$V = 1.0 (\text{L})$$

即ち、

$$C = R \times 0.10 (\mu\text{g} / \text{L})$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた GC/MS の IDL を表 1 に示す (注 5)。

表 1 IDL の算出結果

対象物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
ヘキサクロロエタン	0.067	1.0	1.0	0.000067
ヘキサクロロシクロ ペンタジエン	0.022	1.0	1.0	0.000022

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す（注 6）。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

対象物質名	媒体名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
ヘキサクロロエタン	水質	1.0	1.0	0.000073	0.00019
ヘキサクロロシクロ ペンタジエン	水質	1.0	1.0	0.000071	0.00018

注解

- (注 1) ここで示す製品は実際に使用した商品であるが、これらを推奨するわけではなく、これらと同等以上の品質、性能のものを用いても問題ない。
- (注 2) *p*-ブロモフルオロベンゼンは、ナフタレン-*d*₈に妨害ピークが出現した時に、ナフタレン-*d*₈に代わる内標準物質として使用することが可能である。
- (注 3) 計量器具については JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。
- (注 4) マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2%以下となることを担保しておくのが望ましい。
- (注 5) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従い、表 3 のとおり算出した。IDL 測定時のクロマトグラムを図 1-1～1-3 に示す。

表 3 IDL の算出結果（詳細）

物質名	ヘキサクロロエタン	ヘキサクロロ シクロペンタジエン
試料量 (L)	1.0	1.0
最終液量 (mL)	1.0	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	0.50
注入量 (pg)	0.50	0.50
装置注入液量 (μL)	1.0	1.0
結果 1 (pg)	0.504	0.524
結果 2 (pg)	0.504	0.513
結果 3 (pg)	0.524	0.516
結果 4 (pg)	0.525	0.524
結果 5 (pg)	0.522	0.522
結果 6 (pg)	0.546	0.514
結果 7 (pg)	0.545	0.528
平均値 (pg)	0.5243	0.5200
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.0172	0.0057
IDL (pg)*	0.067	0.022
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.067	0.022
S/N 比	50	10
CV (%)	3.3	1.1

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

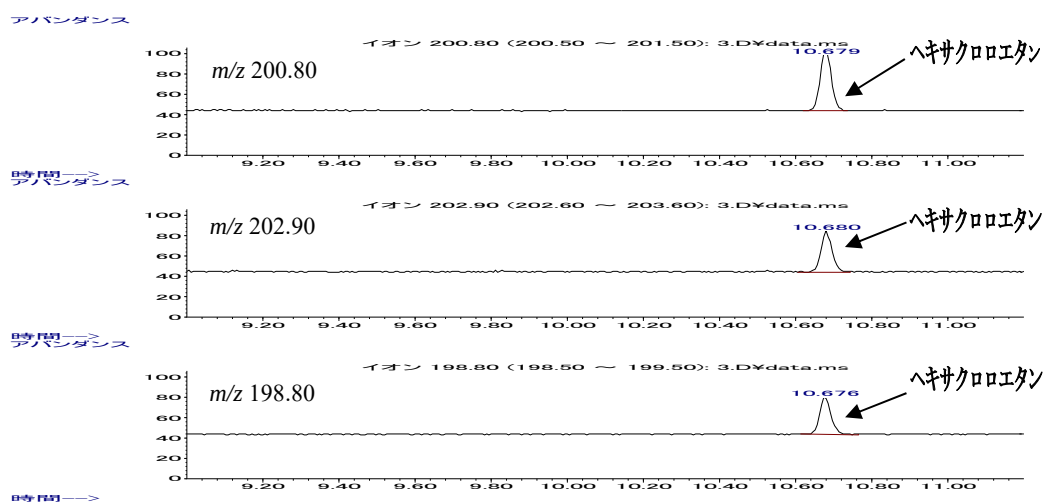


図 1-1 IDL 測定時のクロマトグラム (ヘキサクロロエタン (0.50 ng/mL))

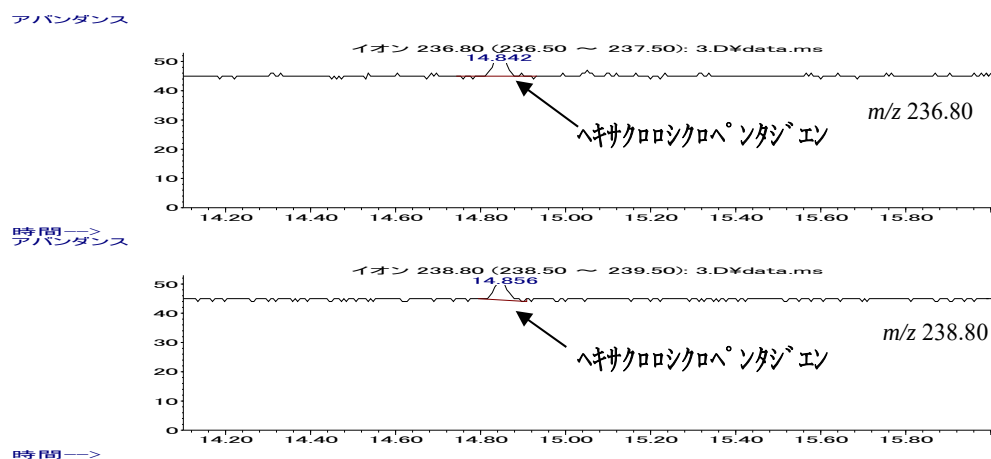


図 1-2 IDL 測定時のクロマトグラム
(ヘキサクロシクロペンタジエン (0.50 ng/mL))

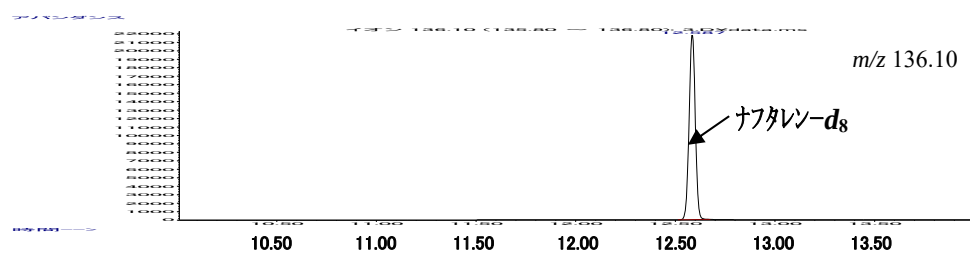


図 1-3 IDL 測定時のクロマトグラム (ナフタレン-d₈ (100 ng/mL))

(注 6) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従い、表 4 及び表 5 のとおり算出した。測定時のクロマトグラムを図 2-1 ～ 2-3 に示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果(ヘキサクロロエタン、詳細)

物質名	ヘキサクロロエタン	回収率 (%)
試料	河川水	
試料量 (L)	1.0	-
標準添加量 (ng)	1.0	-
試料換算濃度 (ng/L)	1.0	-
最終液量 (mL)	1.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	1.0	-
装置注入液量 (μL)	1.0	-
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1}	<0.073	-
無添加平均 (ng/L) ^{*2}	< 0.073	-
結果 1 (ng/L)	0.800	80
結果 2 (ng/L)	0.795	79
結果 3 (ng/L)	0.798	80
結果 4 (ng/L)	0.798	80
結果 5 (ng/L)	0.809	81
結果 6 (ng/L)	0.843	84
結果 7 (ng/L)	0.822	82
平均値 (ng/L)	0.8081	80.8
標準偏差 (σ_{n-1}) (ng/L)	0.0187	
MDL (ng/L) ^{*3}	0.073	
MQL (ng/L) ^{*4}	0.19	
S/N 比	110	
CV (%)	2.9	

*1: 空試験液を測定した値の平均値(n=2)

*2: 無添加試料の平均濃度(n=2)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

表 5 MDL 及び MQL の算出結果(ヘキサクロロシクロペンタジエン、詳細)

物質名	ヘキサクロロ シクロペンタジエン	回収率 (%)
試料	河川水	-
試料量 (L)	1.0	-
標準添加量 (ng)	1.0	-
試料換算濃度 (ng/L)	1.0	-
最終液量 (mL)	1.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	1.0	-
装置注入液量 (μL)	1.0	-
操作ブランク平均 (ng/L)* ¹	< 0.071	-
無添加平均 (ng/L)* ²	< 0.071	-
結果 1 (ng/L)	0.829	83
結果 2 (ng/L)	0.825	83
結果 3 (ng/L)	0.809	81
結果 4 (ng/L)	0.810	81
結果 5 (ng/L)	0.809	81
結果 6 (ng/L)	0.860	86
結果 7 (ng/L)	0.816	82
平均値 (ng/L)	0.8225	82.2
標準偏差 (σ _{n-1}) (ng/L)	0.0183	
MDL (ng/L)* ³	0.071	
MQL (ng/L)* ⁴	0.18	
S/N 比	18	
CV (%)	2.9	

*1: 空試験液を測定した値の平均値(n=2)

*2: 無添加試料の平均濃度(n=2)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

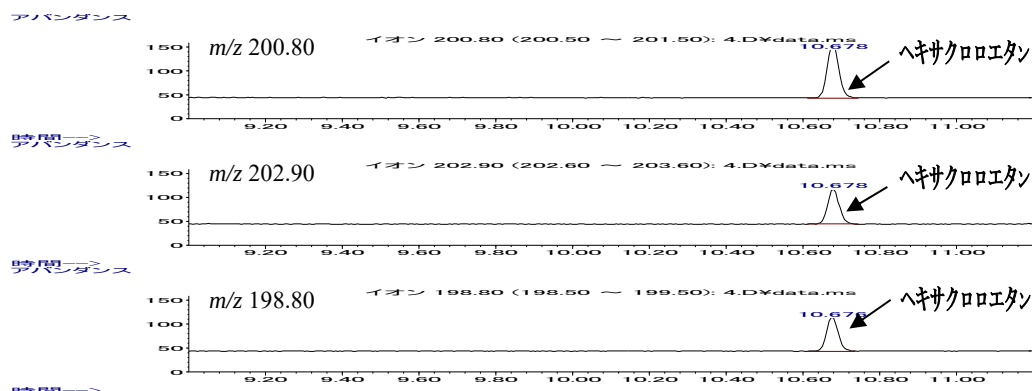


図 2-1 MDL 測定時のクロマトグラム (ヘキサクロロエタン(1.0 ng/L))

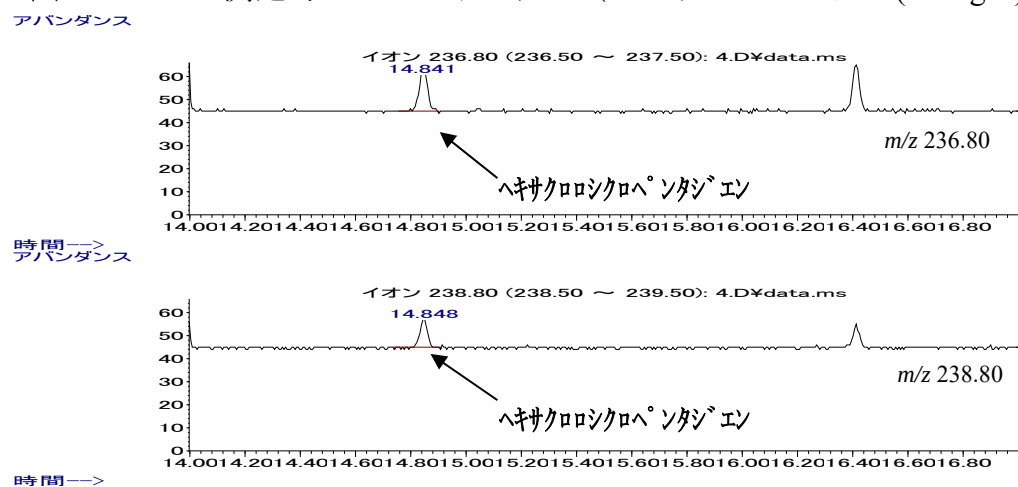


図 2-2 MDL 測定時のクロマトグラム
(ヘキサクロシクロペンタジエン (1.0 ng/L))

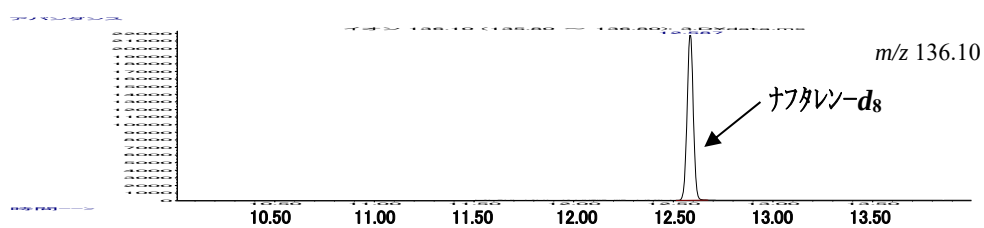


図 2-3 MDL 測定時のクロマトグラム (ナフタレン-d₈(100 ng/mL))

§ 2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図 3 に示す。

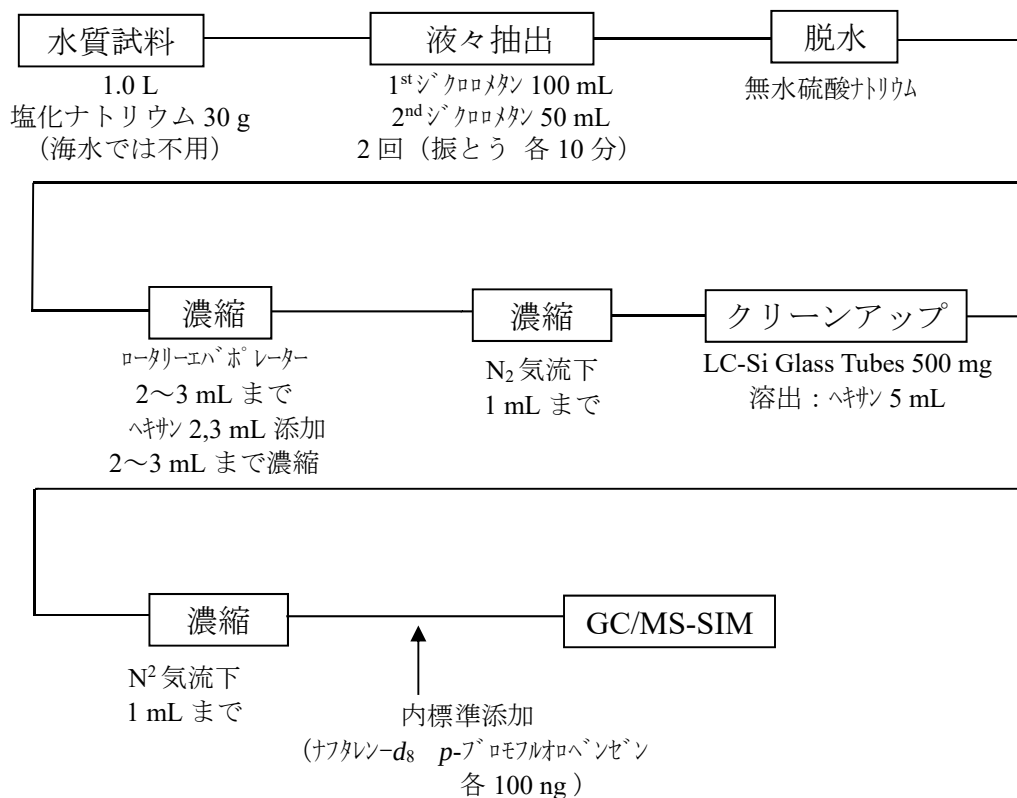


図 3 分析法のフローチャート

[検量線]

検量線を図 4-1、4-2 に検量線作成用データを表 6 及び 表 7 に示した。

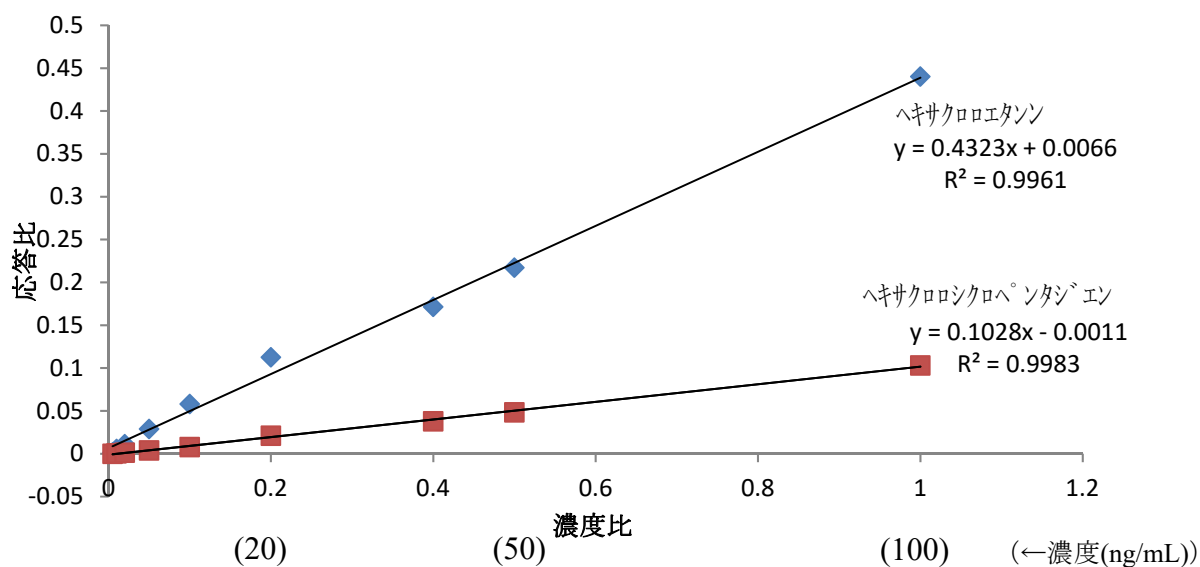


図 4-1 検量線（低～高濃度域）
(0.50 ～100 ng/mL、内標準物質：100 ng/mL)

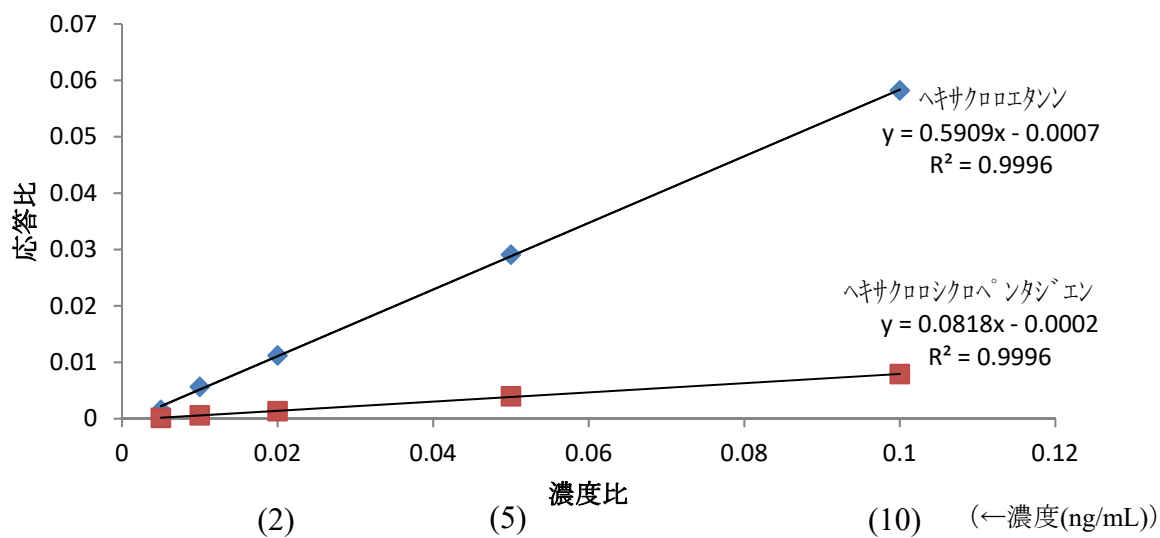


図 4-2 検量線（低濃度域）
(0.50～10 ng/mL、内標準物質：100 ng/mL)

表 6 検量線作成用データ (ヘキサクロロエタン)

濃度比 (Cs/Cis*)	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質(As) 【ヘキサクロロ エタン】 (m/z 200.80)	標準物質(Ais) 【ナフタレン -d ₈ 】 (m/z 136.10)	
0.0050	0.50	2364	882653	0.0026
0.010	1.0	4799	849287	0.0057
0.020	2.0	9338	833778	0.0112
0.050	5.0	23153	795791	0.2910
0.10	10	42915	737544	0.0582
0.20	20	82956	736291	0.1127
0.40	40	119035	693794	0.1716
0.50	50	142540	656159	0.2172
1.0	100	298029	676955	0.4402

* : 内標準濃度 : 100 ng/mL (Cis)

表 7 検量線作成用データ (ヘキサクロロシクロペンタジエン)

濃度比 (Cs/Cis*)	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質(As) 【ヘキサクロロ シクロペンタジ エン】 (m/z 200.80)	標準物質(Ais) 【ナフタレン -d ₈ 】 (m/z 136.10)	
0.0050	0.50	130.87	882653	0.0001
0.010	1.0	510.5	849287	0.0006
0.020	2.0	1112	833778	0.0013
0.050	5.0	3145	795791	0.0040
0.10	10	5830	737544	0.0079
0.20	20	15654	736291	0.0213
0.40	40	26374	693794	0.0380
0.50	50	31769	656159	0.0484
1.0	100	69808	676955	0.1031

* : 内標準濃度 : 100 ng/mL (Cis)

〔クロマトグラム〕

ヘキサクロロエタン、ヘキサクロロシクロペンタジエンおよび内標物質のクロマトグラムを図5に示す。

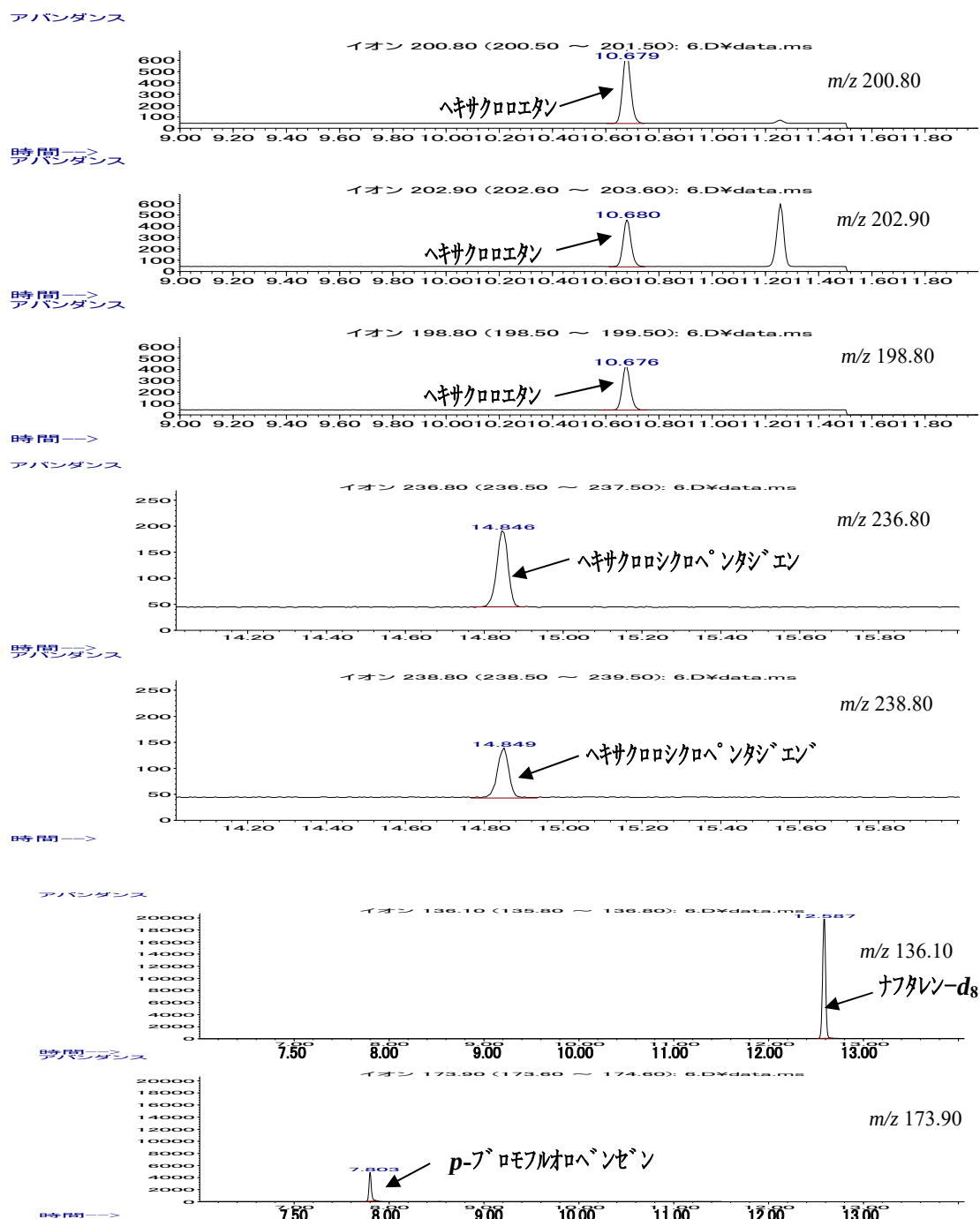


図5 標準液のクロマトグラム
(対象物質：5.0 ng/mL、内標準物質：100 ng/mL)

[マススペクトル]

対象物質および内標準物質のマススペクトルを図 6-1 ～ 図 6-4 示す。

アバundance

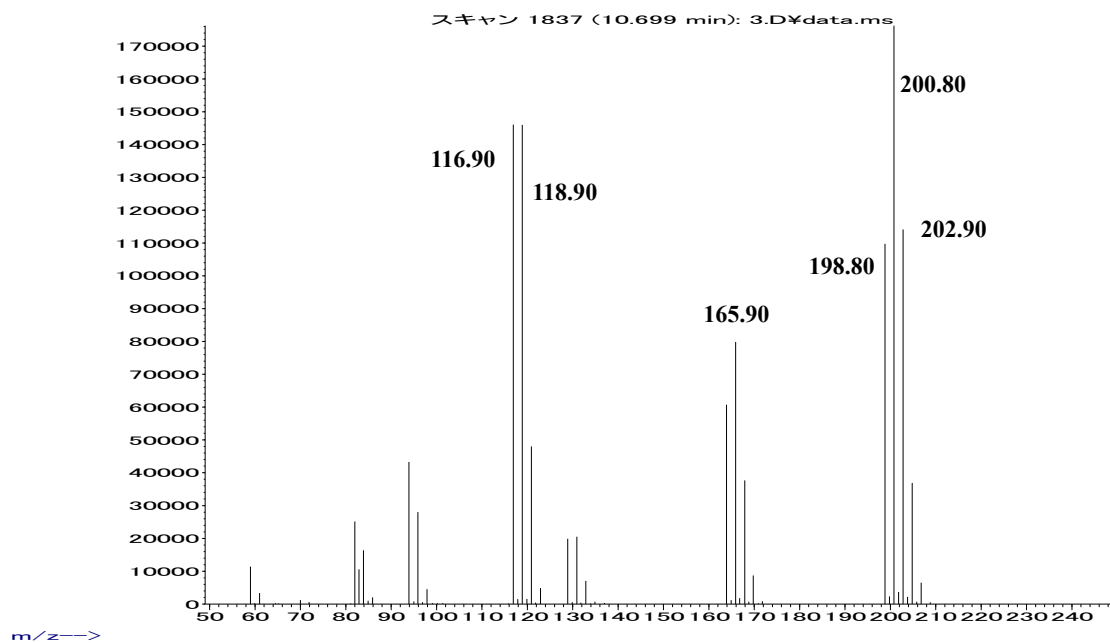


図 6-1 ヘキサクロロエタンのマススペクトル

アバundance

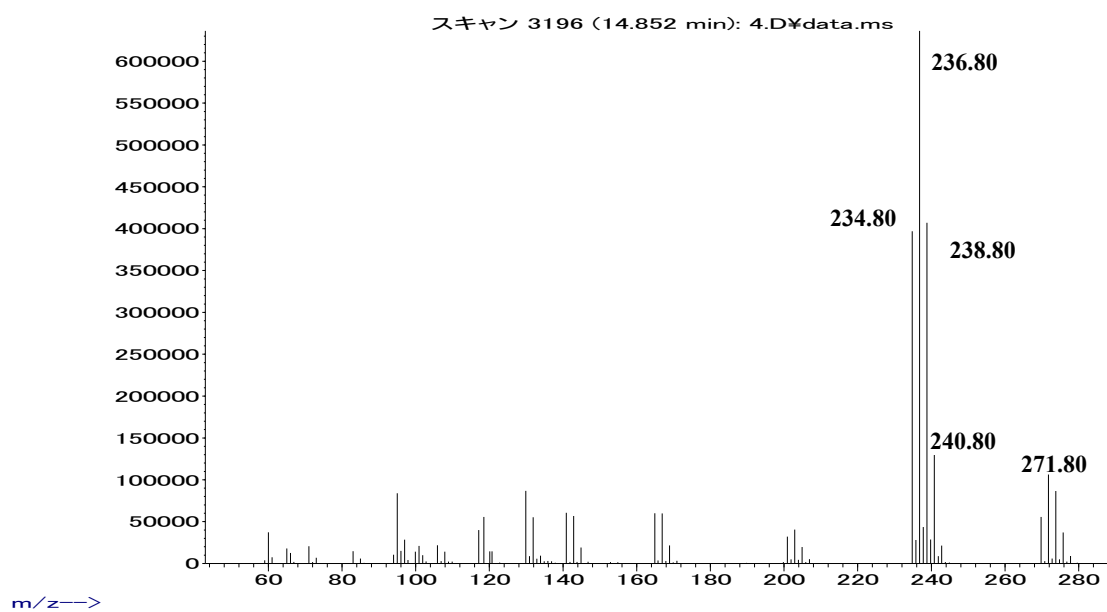


図 6-2 ヘキサクロロシクロペンタジエンのマススペクトル

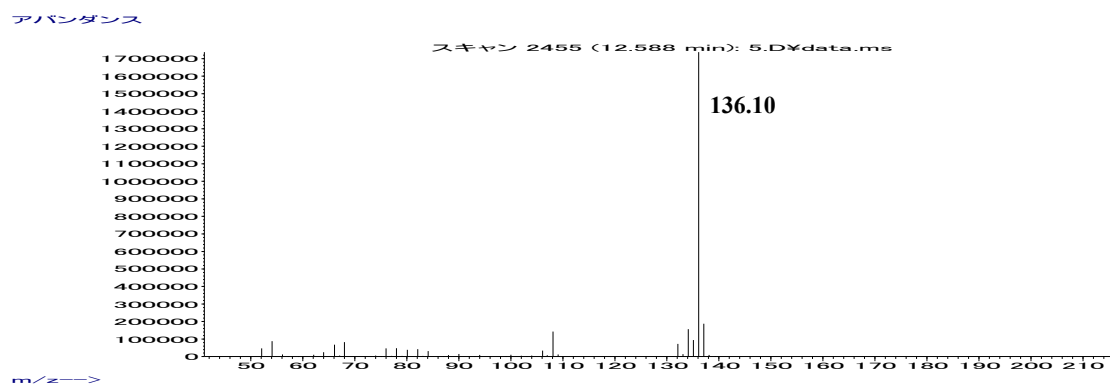


図 6-3 ナフタレン- d_8 のマススペクトル

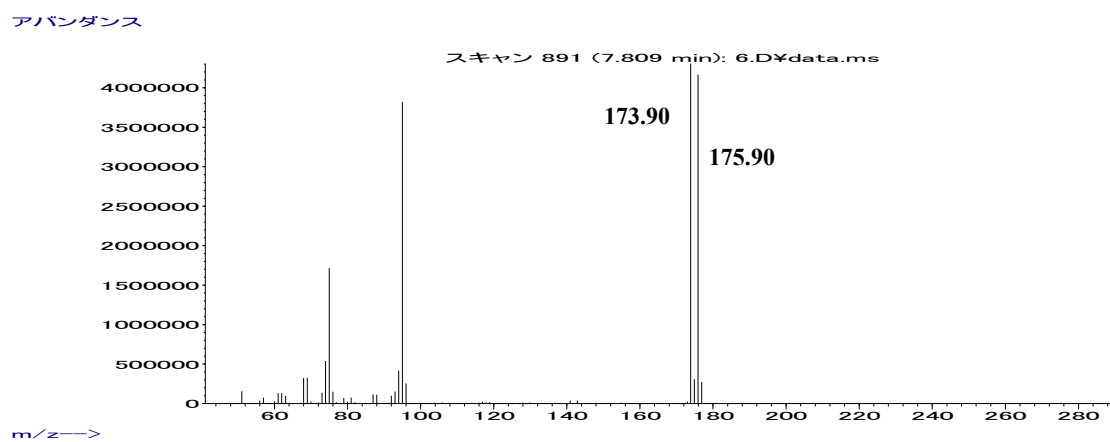


図 6-4 *p*-ブロモフルオロベンゼンのマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験の結果を図7に示した。対象物質はMDL未満であった。

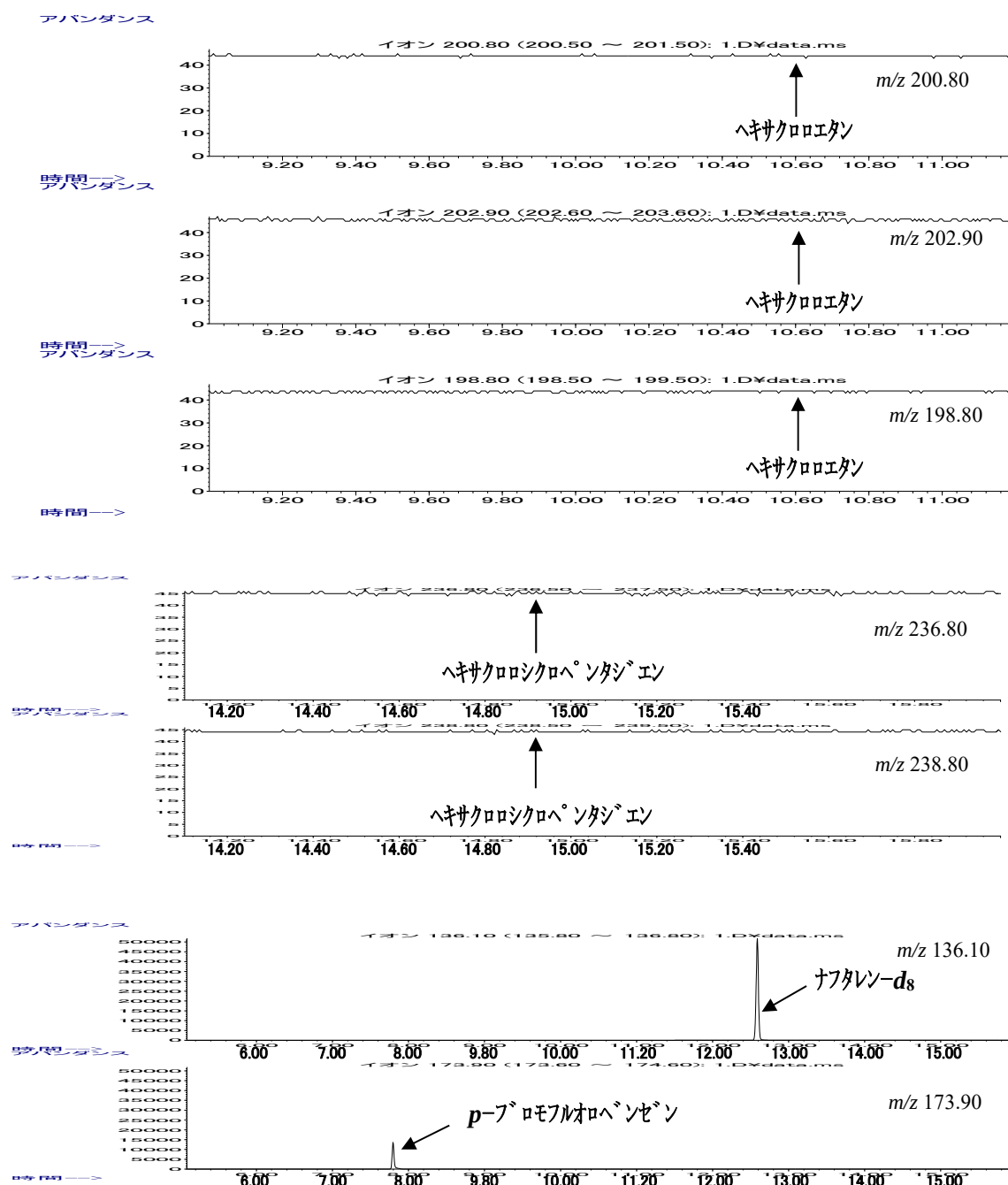


図7 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（榎野川）、海水（萩沖）への添加回収試験結果を表 8 及び表 9、添加回収時のクロマトグラムを図 8-1、8-2、8-3 及び図 8-4 、図 9-1、9-2、9-3 及び図 9-4 に示す。

表 8 添加回収試験結果（ヘキサクロロエタン）

試料名	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	1.0	0	3	< 0.073	-	-
（榎野川）	1.0	14	3	11.9	85	6.9
海水	1.0	0	2	<0.073	-	-
（萩沖）	1.0	14	2	13.3	95	5.6

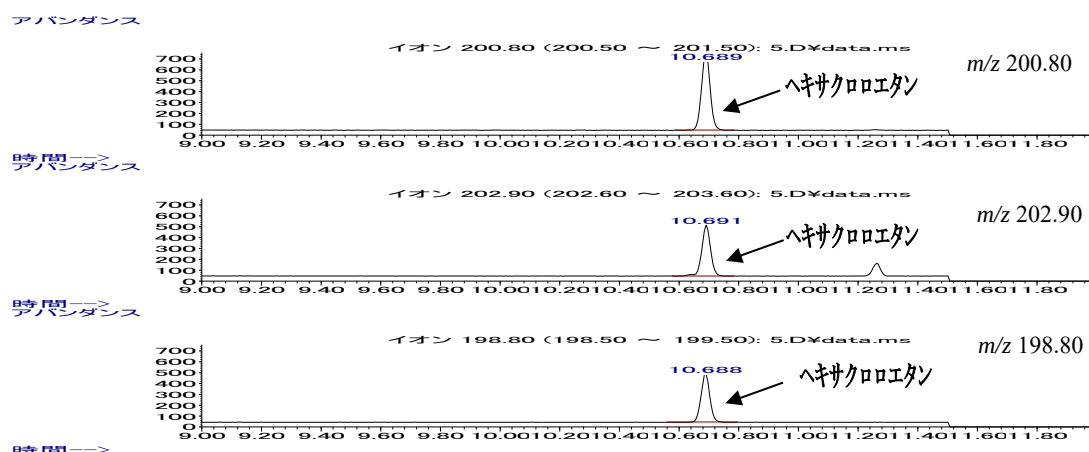


図 8-1 河川水添加回収試験試料（ヘキサクロロエタン 榎野川）のクロマトグラム

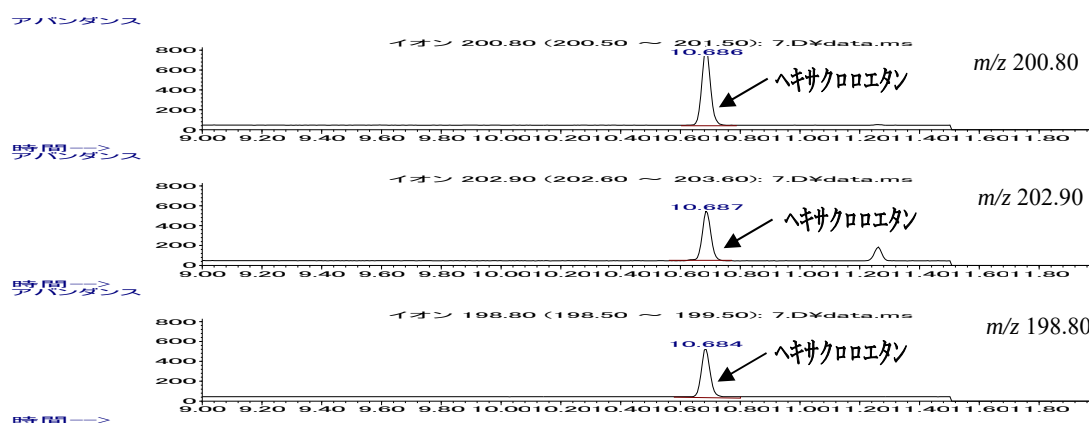


図 8-2 海水添加回収試験試料（ヘキサクロロエタン 萩沖）のクロマトグラム

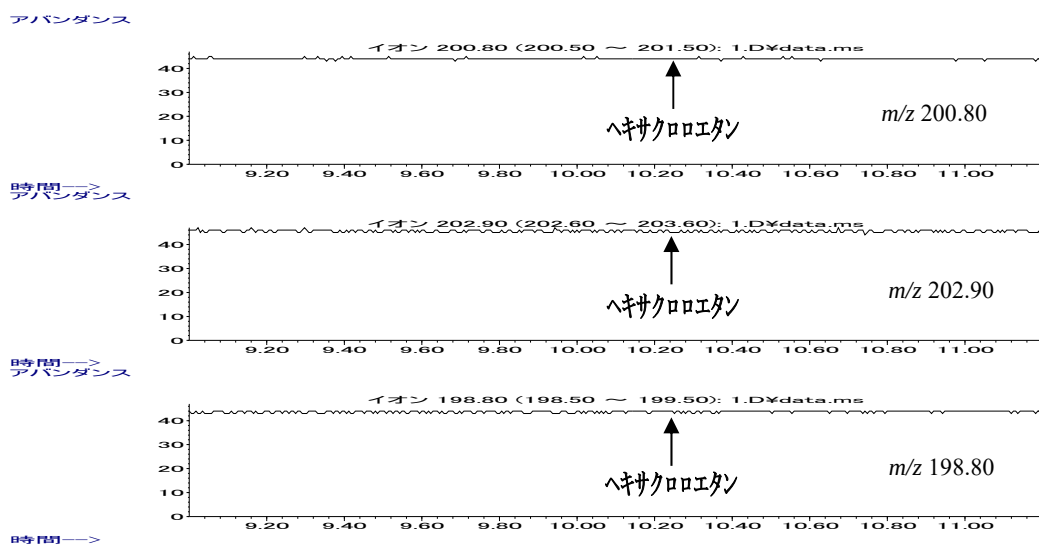


図 8-3 河川水無添加試料（ヘキサクロロエタン 榎野川）のクロマトグラム

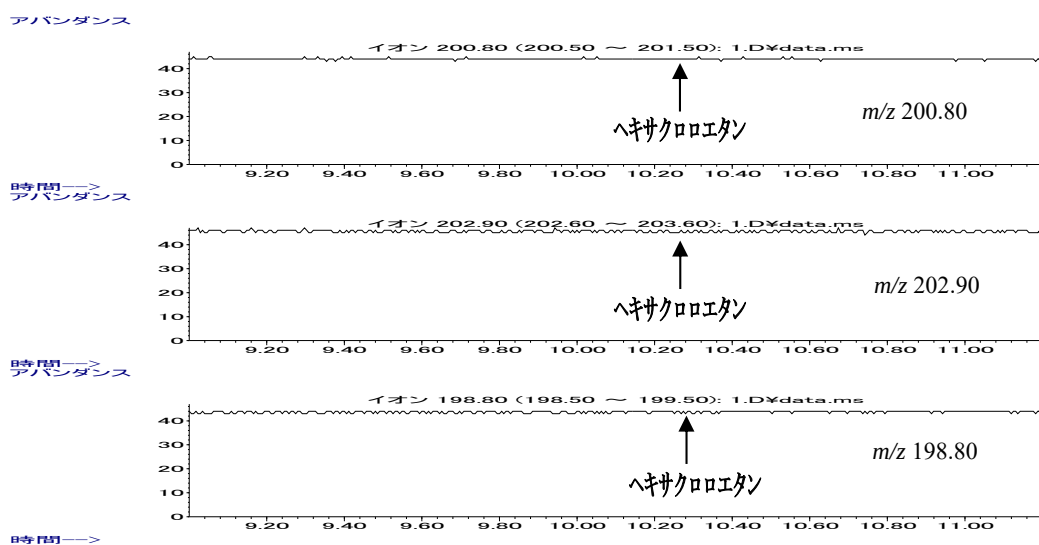


図 8-4 海水無添加試料（ヘキサクロロエタン 榎野川）のクロマトグラム

表 9 添加回収試験結果（ヘキサクロロシクロペンタジエン）

試料名	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	1.0	0	3	< 0.071	-	-
（榎野川）	1.0	14	3	14.0	100	7.3
海水	1.0	0	2	< 0.071	-	-
（榎野川）	1.0	14	2	11.2	80	8.1

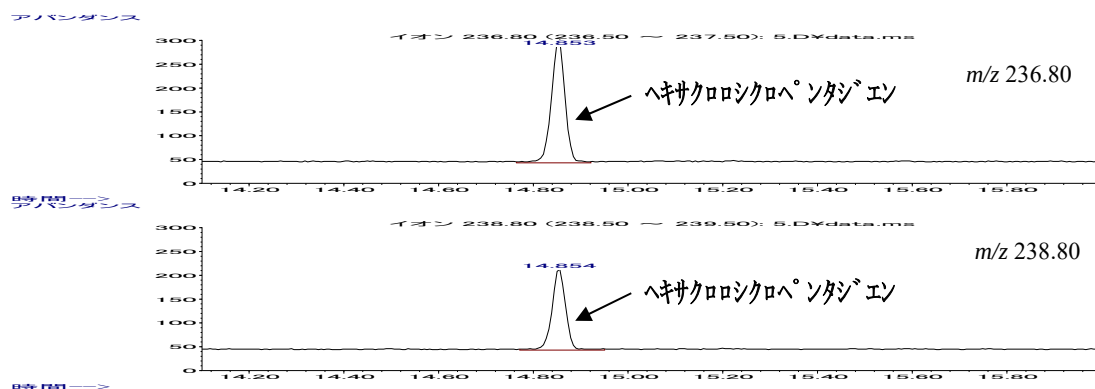


図 9-1 河川水添加回収試験試料（ヘキサクロシクロペンタジエン 榎野川）のクロマトグラム

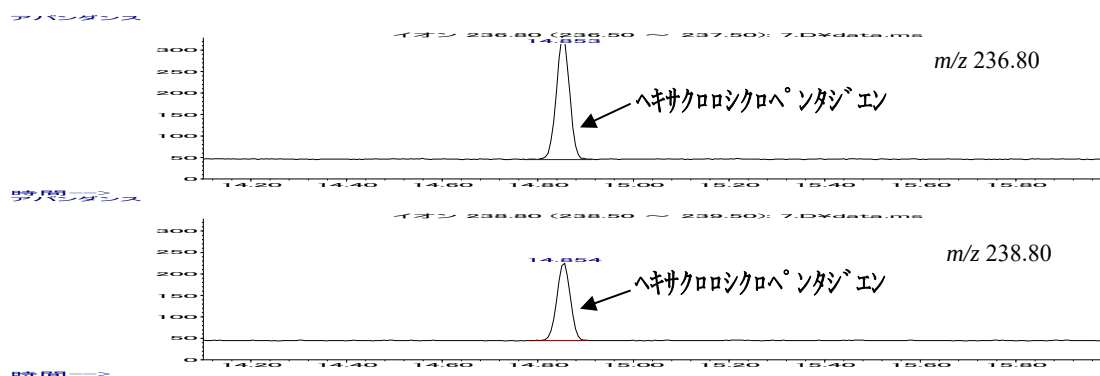


図 9-2 海水添加回収試験試料（ヘキサクロシクロペンタジエン 萩沖）のクロマトグラム

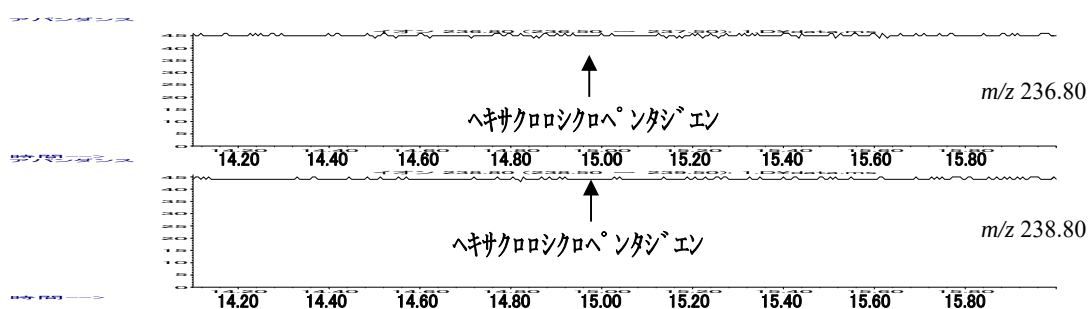


図 9-3 河川水無添加試料（ヘキサクロシクロペンタジエン 榎野川）のクロマトグラム

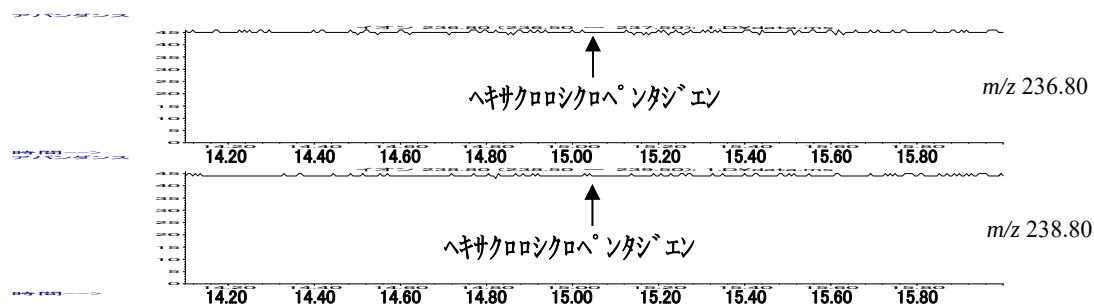


図 9-4 海水無添加試料（ヘキサクロロシクロペンタジエン 萩沖）のクロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 10 に示す。

pH を 5、7、9 に調整した海水（萩沖）にヘキサクロロエタン及びヘキサクロロシクロペンタジエンを各 10 ng/L となるように添加し、メジウム瓶に分注後、密栓し、逆さまにして、暗所（pH 7 については明所でも実施）で 20 °C ± 5 °C の温度条件で 7 日間保存した。その後、濃度を測定して調製濃度に対する残存率を算出した。その結果、ヘキサクロロエタンはどの条件下でも残存率 80% 以上であったが、ヘキサクロロシクロペンタジエンでは pH 5 のみ残存率が 80% 以上であった。また、pH 7 では、両物質とも明所で残存率の低下が認められ、ヘキサクロロシクロペンタジエンでは 50% 以下となった。

表 10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製 濃度 (ng/L)	1 時間放置 後の残存 率(%)	7 日後の残存率	
					暗所 (%)	明所 (%)
ヘキサクロロエタン	5	2	10	99	99	-
	7	2	10	103	94	84
	9	2	10	107	92	-
ヘキサクロロシクロペンタジエン	5	2	10	93	90	-
	7	2	10	100	62	45
	9	2	10	104	61	-

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 11 及び表 12 に示す。水質の保存性試験には、河川水は榎野川の水質試料を、海水は萩沖の水質試料をアスコルビン酸で pH 5 に調整し、標準を添加した検体を使用した。試験液の保存性試験は、1 L に標準物質 10 ng

2020(R2)調査において、採取した試料にアスコルビン酸と標準を添加して約1年間、冷蔵保存したのちに測定した結果により10ヶ月後の残存率が71～77%と安定であることを確認できるデータを入手したため、他機関においてアスコルビン酸添加、冷暗所、密封して保存していれば欠測とせず、78日間保存している試料の測定結果を採用とした事例があった。(2021(R3)精査等検討会コメント)

添加した試料の抽出液を冷蔵保存し、7 日後及び 14 日後に測定した。

標準液の保存性試験は、1 週間後及び 1 ヶ月後に新しい標準液を作製し、1 週間前及び 1 ヶ月前に調製後-20℃で保存した標準液を測定して算出した。

両物質とも、河川水及び海水試料は 7 日間、標準液は 1 ヶ月間安定であった。

表 11 保存性試験結果(ヘキサクロロエタン)

試料名	試験数	調製濃度 (ng/L)	残存率 (%)		
			7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水(榎野川)	2	10	102	-	-
海水(萩沖)	2	10	106	-	-
試験液	2	10	103	103	-
標準液	2	10	100	101	102

表 12 保存性試験結果(ヘキサクロロシクロペンタジエン)

試料名	試験数	調製濃度 (ng/L)	残存率 (%)		
			7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水(榎野川)	2	10	81	-	-
海水(萩沖)	2	10	80	-	-
試験液	2	10	103	103	-
標準液	2	10	100	102	101

〔クリーンアップの検討〕

シリカカートリッジによるクリーンアップを検討した。SUPELCO 製 Supelclean LC-Si に標準液 100 ng/mL (ヘキサン溶液) 1 mL を負荷し、回収率を確認した。

あらかじめヘキサン 5 mL でコンディショニングして標準液を負荷後、ヘキサンで溶出した結果を図 10 に示す。最初のヘキサン 5 mL にヘキサクロロエタン 93%、ヘキサクロロシクロペンタジエン 95% が溶出されたため、溶出液 5 mL を試験液とした。

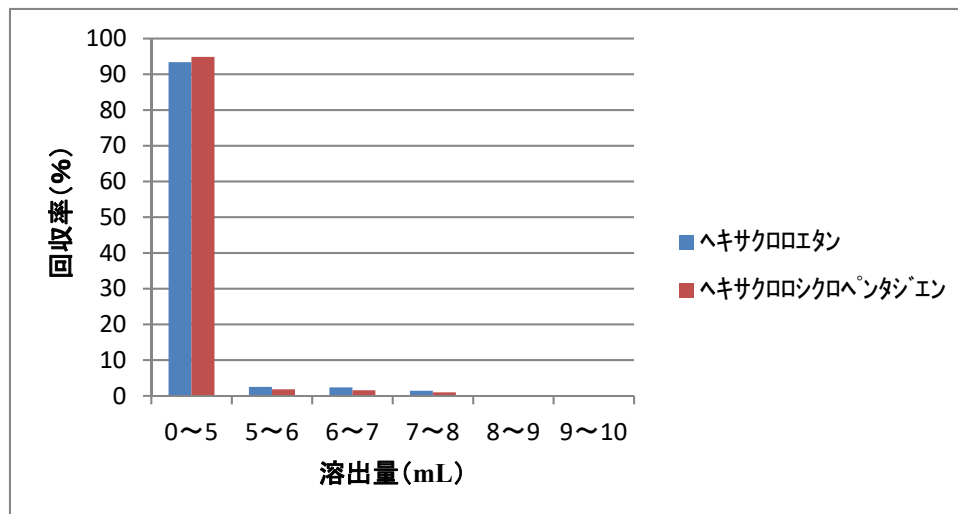


図 10 溶出試験結果

〔他の内標準物質の検討〕

環境試料（河川水）の分析を行ったところ、ナフタレン- d_8 に妨害ピークが現れたため、ナフタレン- d_8 に代わる内標準物質について検討を行った。フルオロベンゼンと p -ブロモフルオロベンゼンの混合液を内標準物質として検討を行った結果のクロマトグラムを図 11、 p -ブロモフルオロベンゼンを内標準物質として使用した時の検量線を図 12 に示す。

p -ブロモフルオロベンゼンを内標準物質とした場合も良好な直線性が認められたので、ナフタレン- d_8 の代わりに p -ブロモフルオロベンゼンを使用することが可能と考えられた。

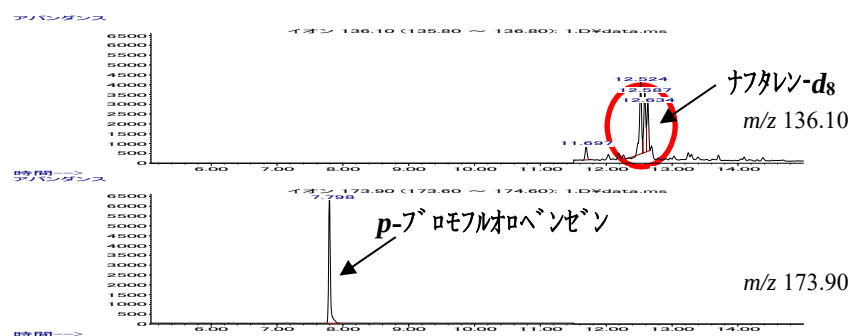


図 11 内標準物質のクロマトグラム

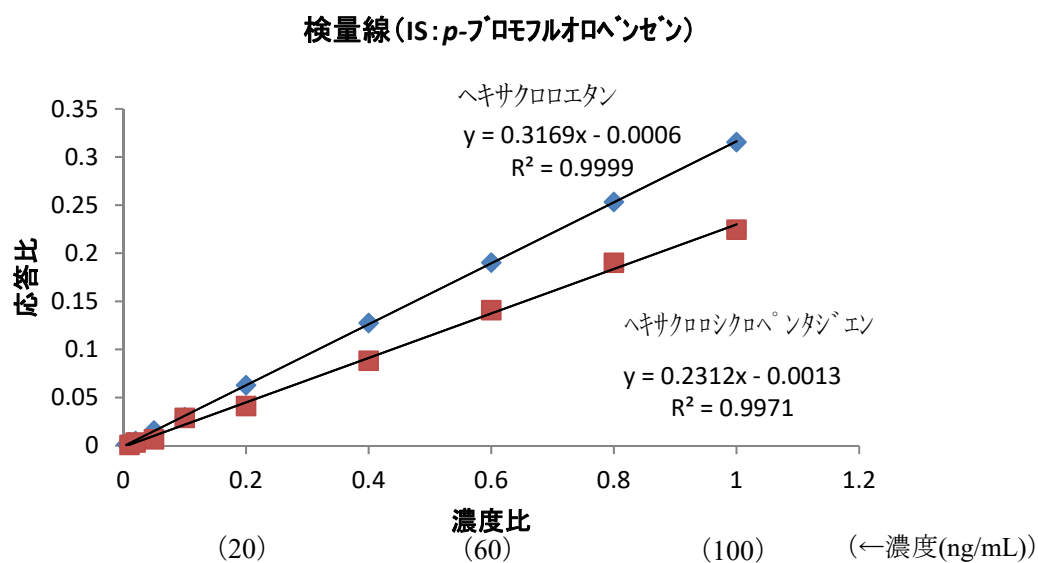


図 12 検量線 (内標準: *p*-ブロモフルオロベンゼン、低～高濃度域)

〔環境試料の分析〕

本法により、山口県内の河川水及び海水を分析した。図 13 に河川水のクロマトグラムを、図 14 海水のクロマトグラムを示す。河川水と海水のいずれからともヘキサクロロエタン及びヘキサクロシクロペンタジエンは検出されなかった。

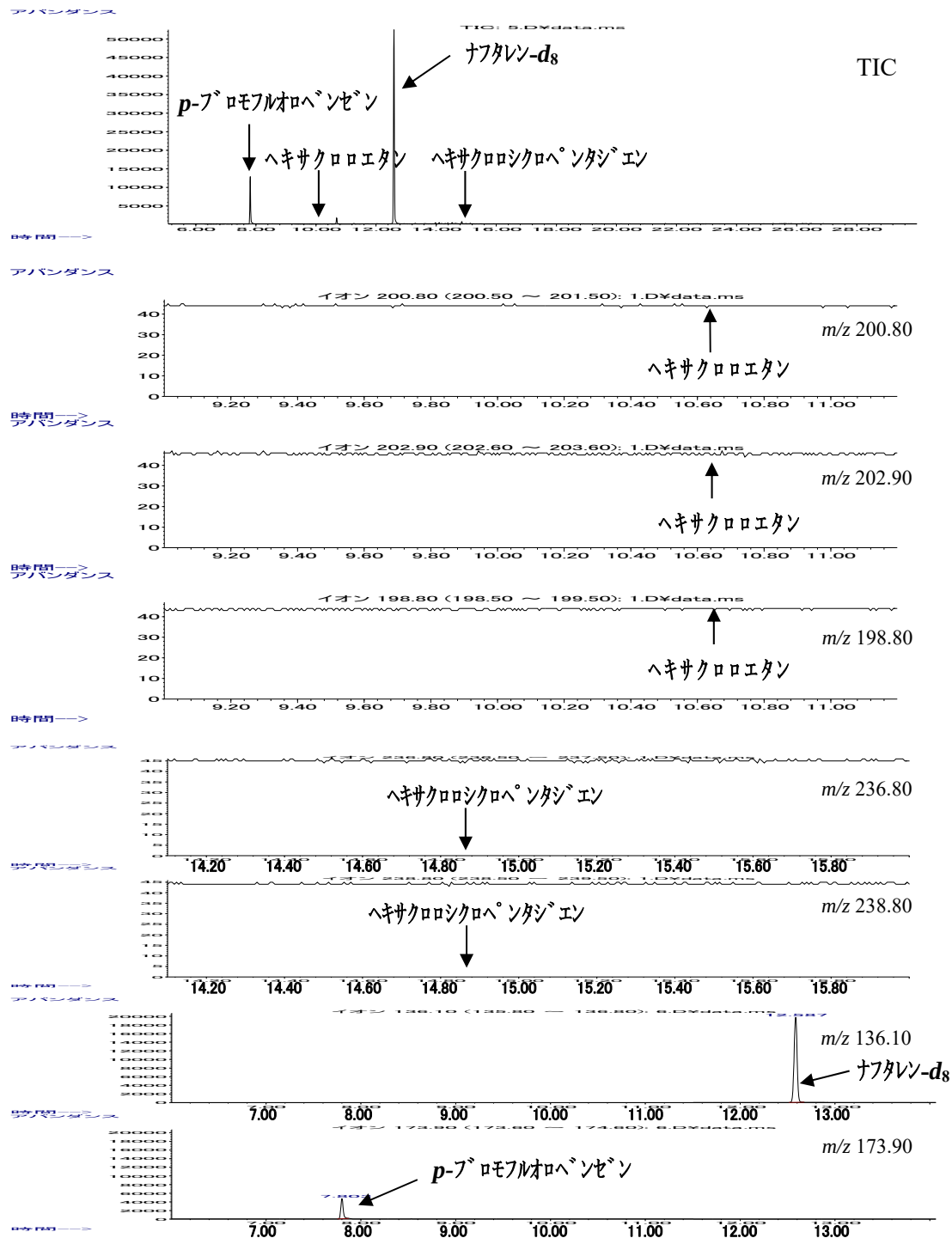


図 13 河川水のクロマトグラム

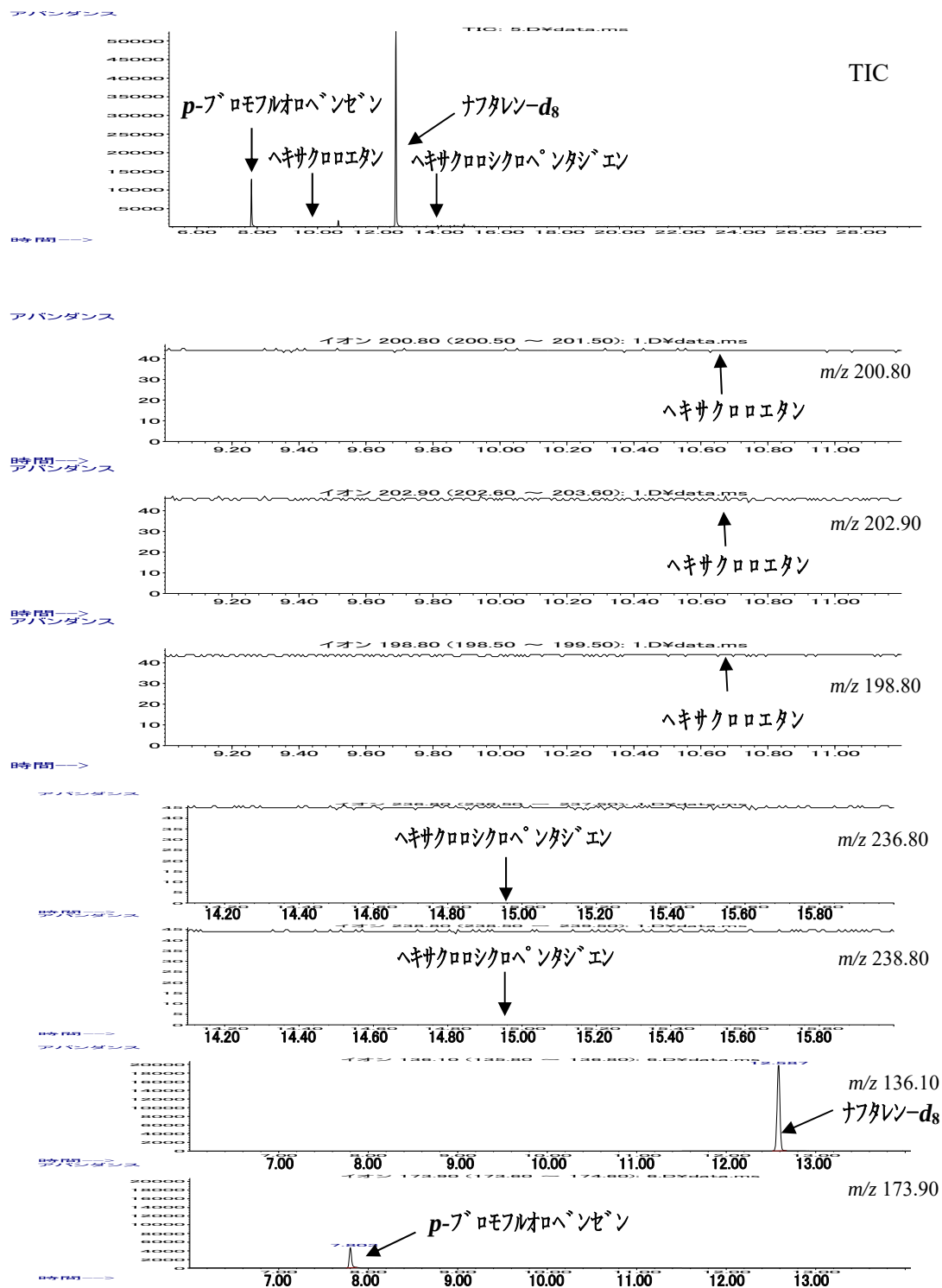


図 14 海水のクロマトグラム

【評価】

本法は、環境水中のヘキサクロロエタンの MDL が 0.000073 $\mu\text{g/L}$ 、MQL が 0.00019 $\mu\text{g/L}$ であり、添加回収試験での回収率は河川水で 85% (変動係数 6.9%)、海水で 95% (変動係数 5.6%) であった。また、ヘキサクロロシクロペンタジエンの MDL が 0.000071 $\mu\text{g/L}$ 、MQL が 0.00018 $\mu\text{g/L}$ であり、添加回収試験での回収率は河川水で 100% (変動係数 7.3%)、海水で 80% (変動係数 8.1%) であった。以上から、本法は環境水中のヘキサクロロエタンとヘキサクロロシクロペンタジエンを 0.00007 $\mu\text{g/L}$ レベルで検出可能と判断される。なお、山口県内の河川水及び海水について測定を行ったところ、どちらも MDL 未満であった。

【担当者連絡先】

所属先名称 : 山口県環境保健センター

所属先住所 : 〒753-0871 山口県山口市朝田 535

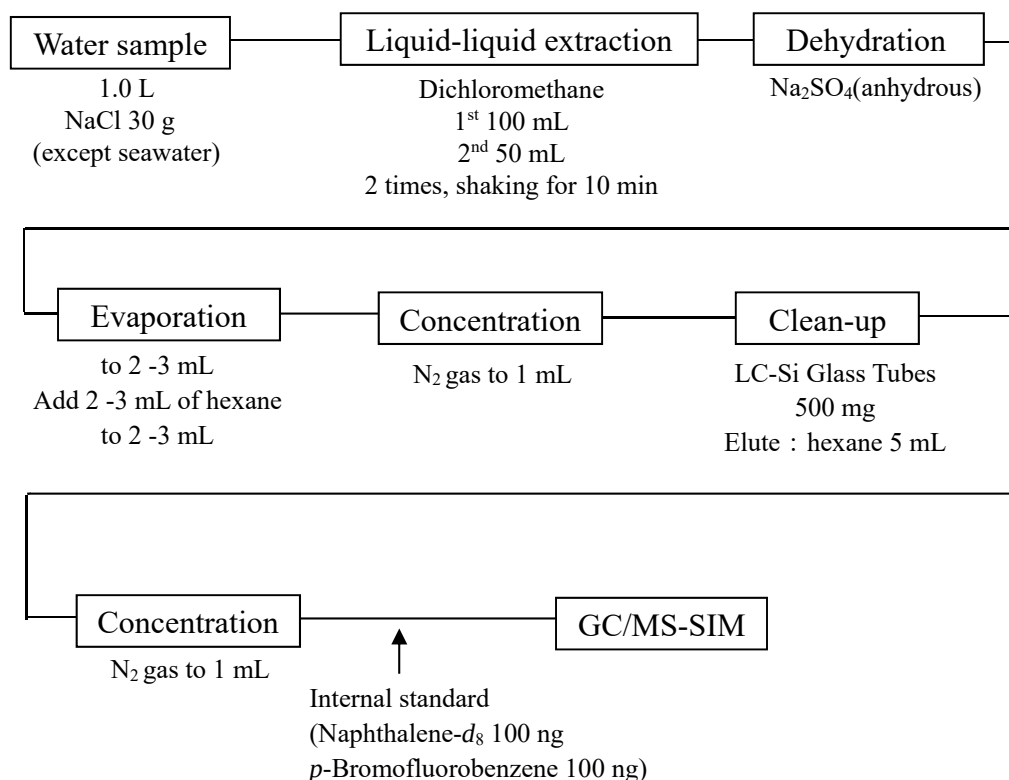
TEL : 083-924-3670 FAX : 083-924-3673

担当者名 : 堀切 裕子

E-mail : horikiri.yuko@pref.yamaguchi.lg.jp

Hexachloroethane and Hexachlorocyclopentadiene

A method provides procedures for the determination of hexachloroethane and hexachlorocyclopentadiene in water samples by using gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring (GC/MS-SIM). A water sample (1 L) is added with 30 g NaCl (except seawater), and then is extracted with dichloromethane 2 times. The extract is dehydrated with anhydrous sodium sulfate. After adding 2-3 mL of hexane to the extract, it is concentrated to 2-3 mL using a rotary evaporator (750hPa, 37°C). Further, the concentrate is concentrated to 1 mL under a gentle stream of nitrogen. Naphthalene-*d*₈ and *p*-bromofluorobenzene is added as internal standards to the concentrate, and then 1 µL of the concentrate is injected into a GC-MS for determination. The instrument detection limits (IDL) of hexachloroethane and hexachlorocyclopentadiene are 0.067 pg and 0.022 pg, respectively. Their method detection limits (MDL) and the method quantification limits (MQL) are 0.073 ng/L, 0.071 ng/L and 0.19 ng/L, 0.18 ng/L, respectively. Average recoveries of 14 ng of hexachloroethane and hexachlorocyclopentadiene added to river water were 85% and 100%, respectively. Average recoveries of 14 ng of hexachloroethane and hexachlorocyclopentadiene added to seawater were 95% and 80%, respectively. As a result of analysis of river water and seawater in Yamaguchi prefecture by the developed method, hexachloroethane and hexachlorocyclopentadiene were not detected.



物質名	分析法フローシート	備考
[1] ヘキサクロロエタン 別名： ペンタクロロエチレン 1,1,1,2,2,2-クロロエタン 六塩化エタン [2] ヘキサクロロシクロヘンタシエン	【水質】 <pre> graph LR A["水質試料 1.0 L 塩化ナトリウム 30 g (海水では不用)"] --> B["液々抽出 ジクロロメタン 100 mL、50 mL 計 2 回抽出"] B --> C["脱水 無水硫酸ナトリウム"] C --> D["濃縮 ロータリーエバポレータ ヘキサン 2,3 mL 添加後 2～3 mL まで"] D --> E["濃縮 N² 気流下 1 mL まで"] E --> F["濃縮 N² 気流下 1 mL まで"] F --> G["GC/MS-SIM"] H["内標準添加 (ナフタレン-d₈ p-プロモフルオロベンゼン 各 100 ng)"] --> G </pre>	分析原理： GC/MS-SIM 検出下限値： 【水質】(μg/L) [1] 0.000073 [2] 0.000071 条件： 機器 GC：Agilent 製 7890A MS：Agilent 製 5975C カラム DB-5MS UI 30 m×0.25 mm, 0.25 μm

フタル酸ジノニル

Dinonyl-phthalate

IUPAC 名：Benzene-1,2-di-carboxylic acid-di-nonyl

別名：DINP、フタル酸ジイソノニル

ベンゼン-1,2-ジカルボン酸ジイソデシル

Benzene-1,2-dicarboxylic acid diisodecyl

別名：DIDP、フタル酸ジイソデシル

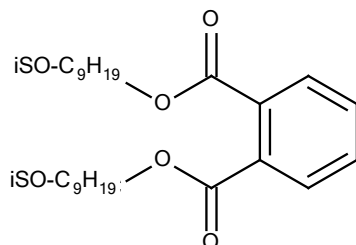
ジウンデカン-1-イル=フタラート

Diundecane-1-yl-phthalate

IUPAC 名：Benzene-1,2-di-carboxylic acid-di-undecyl

別名：DUP、フタル酸ジウンデシル

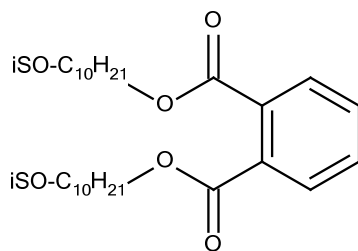
【対象物質の構造】



物質名：フタル酸ジイソノニル

CAS 番号：28553-12-0

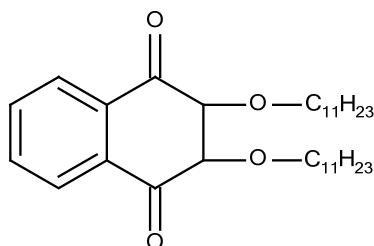
分子式：C₂₆H₄₂O₄



物質名：フタル酸ジイソデシル

CAS 番号：26761-40-0

分子式：C₂₈H₄₆O₄



物質名：フタル酸ジウンデシル

CAS 番号：85507-79-5

分子式：C₃₀H₅₀O₄

【物理化学的性状】¹⁻³⁾

項目	フタル酸ジイソ ノニル(C9)	フタル酸ジイソ デシル(C10)	フタル酸ジウン デシル(C11)
分子量	418.62	446.67	474.72
モノアイソトピック質量	418.30831	446.33961	474.37091
融点 (°C)	-48 (イソ体)	-50 (イソ体)	35.5 (ノルマル)
沸点 (°C)	370 (イソ体)	250～257(0.5kpa)	523 (ノルマル)
蒸気圧 (hPa)	0.6	0.3 (200°C)	
比重 (g/cm ³)	0.98 (イソ体)	0.96 (イソ体)	
溶解性 (μg/L)	< 1 (不溶)	< 1 (不溶)	< 1 (不溶)
log P _{ow}	8.8 (イソ体)	4.9 (イソ体)	4.95

【毒性、用途】

〔毒性〕

ACGIH、日本産業衛生学会の許容濃度 規定なし 発がん性認められず。
フタル酸ジイソノニルとフタル酸ジイソデシルについて、人への曝露は差し

迫った懸念を生じさせるほど高いものでは、おそらくないであろう。¹⁾

〔実験動物に対する急性毒性情報〕²⁾

水生環境有害性（急性） 分類結果； 区分外

〔用途〕

広範なプラスチック可塑剤、フィルム・シート、フローリング、合成皮革、管材料¹⁾

出典

- 1) U.S. NPT (www.mhlw.go.jp/shingi/2009/06/dl/s0608-8g.pdf アメリカの規制データ日本語訳、厚生労働省 HP より)
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)
- 3) 国立環境研究所：化学物質データベース Webkis-Plus

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

PFA（有機フッ化樹脂）製容器に採取した水質試料に直接サロゲート内標準物質及びヘキサンを添加して液液抽出する。抽出液を LC/MS/MS-SRM (ESI-positive) で測定する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

フタル酸ジノニル	: 富士フィルム和光純薬工業製 特級 (ノニル異性体混合物)
フタル酸ジイソノニル- <i>d</i> ₄	: Toronto Research Chemicals 製
フタル酸ジイソデシル	: 富士フィルム和光純薬工業製 フタル酸エステル試験用
フタル酸ジイソデシル- <i>d</i> ₄	: Toronto Research Chemicals 製
フタル酸ジウンデシル	: 東京化成工業製 > 98.0% (CAS 番号 96507-86-7)
フタル酸ジウンデシル- <i>d</i> ₄	: CDN isotopes 製

メタノール	: 富士フィルム和光純薬工業製 LC/MS 用
ヘキサン	: 富士フィルム和光純薬工業製 インフィニティーピュア
精製水	: 富士フィルム和光純薬工業製 超純水 PFOS、PFOA 測定用

【標準液の調製】

〔標準液〕

フタル酸エステル各 100 mg を正確に量り取り、それぞれメタノール 100 mL に溶解し、1000 µg/mL に調製したものを標準原液とする。各標準原液をメタノールで混合希釈し、各フタル酸エステルの濃度が、C9:2.0 µg/mL、C10:1.0 µg/mL、C11:0.25 µg/mL になるように調製したものを混合標準液とする。

〔サロゲート内標準液〕

フタル酸エステル- d_4 の各標準試薬をそれぞれメタノールに溶解し、1000 µg/mL に調製したものをサロゲート内標準原液とする。各サロゲート内標準原液をメタノールで混合希釈し、各フタル酸エステル- d_4 の濃度が 0.10 µg/mL になるように調製したものを混合サロゲート内標準液とする。

〔検量線用標準液の調製〕

混合標準液を混合サロゲート内標準液と合わせてヘキサンで適宜希釈したものを検量線用標準液とする。各濃度の標準液は、各フタル酸エステルとして C9:2.0~200 ng/mL、C10:1.0~100 ng/mL、C11:0.25~25 ng/mL、各フタル酸エステル- d_4 としてそれぞれ 1.0 ng/mL に相当するように調製する。

【その他の試薬の調製】

〔ヘキサン〕

100 mL の PFA 洗浄瓶にヘキサンを移し、速やかにふたを閉めて使用する。ヘキサン及び PFA 容器の内側には、空気のほか、何も触れさせないようにする。ピペットなどを用いてはならない。

【器具】（注 1）

PFA（有機フッ素樹脂）製洗浄瓶(100 mL)、PFA 製試料採取容器（100 mL、酸洗浄パック 細口タイプ: ビニールで密閉されている。採水時に開封して使用する。）、定量器具、上皿天秤（0.01 g が測定できるもの）、測定用バイアル（未開封）、アルミ箔（20 mm 四方形度、ヘキサン洗浄）、保護手袋（作業者

の手は汚染源、プラスチック製は避ける)

【試薬の安全性・毒性】

高濃度では中毒の危険性があるので、標準試薬を取り扱うときはドラフトの中で行うなど室内を汚染しないよう注意する。

(3)分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従う。パックされた PFA 製容器(100 mL)を開封して、100 mL の標線まで試料水を入れて蓋をしっかりと閉め、分析まで冷暗所に保存する。試料搬入後は速やかに分析する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 100 mL が入った PFA 製試料採取容器の蓋を取り、重量測定する。容器に入ったままの試料水に、混合サロゲート内標準液(0.10 µg/mL)を 100 µL 添加して混合する。続いて、ヘキサン 10 mL(洗瓶から試料採取容器へ直接加える。添加量の制御は重量で行う。10 mL のヘキサンは 6.55 g)を加えて 4 分間振り混ぜ抽出し(注 2)、2 分間静置後ヘキサン層を試験液とする(注 3)。測定値が確定したら、試料採取容器を空にして、再度重量測定を行い、重量差から試料水量を算出する。試料水の密度は、1.0 g/mL とする。

【空試験液の調製】

水質試料の代わりに精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕(注 4)

使用機種	: 島津製作所製 LCMS-8050
使用カラム	: 昭和電工製 shodex Asahipak C4P-50 4D (4.6 mm × 150 mm, 5 µm)
カラム温度	: 40°C
移動相	: A : 精製水、B : メタノール A:B=5:95
カラム流量	: 0.6 mL/min
注入液量	: 5 µL
イオン化法	: ESI-positive

インターフェイス電圧	: 4.0 kV
コリジョンエネルギー	: 26 eV (C9、C9-d ₄)
	28 eV (C10、C10-d ₄)
	23 eV (C11、C11-d ₄)
インターフェイス温度	: 300°C
脱溶媒ライン温度	: 250°C
ヒートブロック温度	: 400°C
ネブライザーガス流量	: 3.0 L/min
乾燥ガス流量	: 10.0 L/min
加熱ガス流量	: 10.0 L/min
コリジョンガス	: Ar (270 psi)
モニターイオン	: C9 <i>m/z</i> 419 > 149、C9-d ₄ <i>m/z</i> 423 > 153
	C10 <i>m/z</i> 447 > 149、C10-d ₄ <i>m/z</i> 451 > 153
	C11 <i>m/z</i> 475 > 149、C11-d ₄ <i>m/z</i> 479 > 153

〔検量線〕

検量線用標準液 5 μL を LC/MS/MS に注入して分析する。対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 5 μL を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた対象物質のピーク面積とサロゲート内標準のピーク面積の比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度 C (μg/L) は次式から算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めた試料液中のサロゲート内標準に対する対象物質の濃度比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (ng)

(= 添加したサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の量 (μL))

V : 試料量 (mL)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 10 \text{ (ng)}$$

(= 添加したサロゲート内標準液の濃度 (0.10 ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の量 (100 μL))

$$V = 100 \text{ (mL)}$$

即ち、

$$C = R \times 0.10 \text{ (ng/mL)} = R \times 0.10 \text{ (μg/L)}$$

である。

〔装置検出下限値 (IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す (注 5)。

表 1 IDL 算出の結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
C9	1.5	0.10	10	0.031
C10	0.49	0.10	10	0.010
C11	0.074	0.10	10	0.0015

〔分析方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法の MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 6)。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
C9	0.10	10	0.14	0.37
C10	0.10	10	0.028	0.073
C11	0.10	10	0.013	0.033

注 解

- (注 1) 測定は汚染との戦いになる。本法に従えば、試験液に接触するのは、試料採取容器の内側とヘキサン、内標準物質の添加に要するものと測定バイアルだけになる。対象物質は、広く使用されている可塑剤であり、何からでも試料は汚染されうる。特に作業者の手は、大きな汚染源になりうる。試料に接触する器材や試薬は、直前にブランクチェックを行う必要がある。検討に用いた手袋は、質量分析計のメンテナンスキットにあったナイロン製（アジレント製 部品番号 8650-0029 や 8650-0030）のものである。洗浄していったんきれいになったガラス器具も PFA 製品（フロン工業製 洗瓶 F-1010 シリーズ、試料採取容器 アズワン製 アズワン品番 1-7563-12）も、実験室内に置いておくだけで汚染されうる。古いガラス製試験管などに、いくら洗ってもブランクのリスク低減が困難なものもあったため、器具類は未開封であることが望ましい。ガラス製品は、JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。マイクロシリンジ及びマイクロピペットを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2%以下となることを担保しておくのが望ましい。新品のマイクロシリンジでは検量線が描けたが、古いものでは直線性が得られなかった。試料のバイアルのセプタムの代わりに洗浄したアルミ箔を用いる。アルミ箔は、使用直前にヘキサンで洗浄し、バイアルに乗せて、セプタムなしのオープントップキャップを閉めるとよいが、気密があるわけではないので、バイアルを振り混ぜてはならない。通常のセプタムを貫通したサンプリングニードルなどが、試験液に接触するとブランク値が上がり続けることがある。
- (注 2) ヘキサン量が多少ずれても、すでに添加した内標準物質を基準にした内標準法で定量するので、定量精度への影響はほとんどない。容器を分液ロートのように激しく振り混ぜるので、内圧が上昇する。10 秒ほど静置して、ゆっくりふたを緩めて圧抜きをするとよい。試料によってはエマルジョンが生成する。時間をおいて容器ごと超音波洗浄機にかけると、ヘキサン分離量が増加してヘキサン部分だけをバイアルに移せるようになる。
- (注 3) 試験液をバイアルに移しいれるのには、容器を傾け、直接流し入れるとよい。容器は半透明で、ヘキサン層と水層の界面ははっきり見える。ピペットなどを使わずに済み、ブランクのリスクを避けることができる。検討では、全工程で最も汚染を受けやすかったので、バイアルは複数作

るとよい。

(注4) LC/MS/MS の条件は、本測定に使用した機種(島津製作所製 LCMS-8050)の例である。測定する試験液、標準液はヘキサン溶媒なので、打ち込み量が増えると、ピークがゆがむ恐れがある。

(注5) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月) に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	C9	C10	C11
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	2.0	1.0	0.25
注入量 (pg)	10	5.0	1.25
装置注入量 (μL)	5	5	5
結果 1 (pg)	10.0	5.00	1.25
結果 2 (pg)	9.69	5.31	1.22
結果 3 (pg)	10.3	5.07	1.26
結果 4 (pg)	10.1	5.04	1.25
結果 5 (pg)	10.4	5.04	1.21
結果 6 (pg)	10.5	4.91	1.22
結果 7 (pg)	10.9	5.01	1.22
平均値 (pg)	10.28	5.054	1.232
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.396	0.126	0.0191
IDL (pg)*	1.5	0.49	0.074
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.031	0.010	0.0015
S/N 比	31	31	43
CV(%)	3.9	2.5	1.5

*: IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

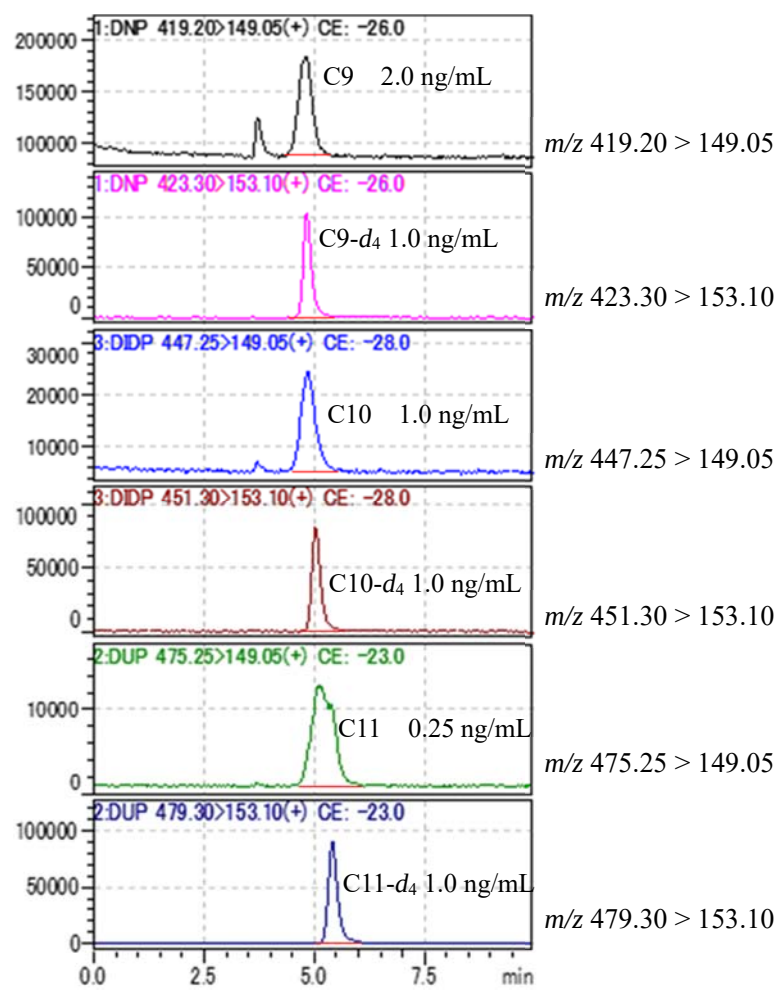


図1 IDL 測定時のクロマトグラム
(C9 2.0 ng/mL、C10 1.0 ng/mL、C11 0.25 ng/mL、
C9-d₄、C9-d₄、C9-d₄ 各 1.0 ng/mL)

(注 6) 表 4-1～4-3 は、標準物質を添加した精製水と、無添加の操作ブランクから算出した MDL 及び MQL の参考値である。これらの結果から、C9 の MDL は操作ブランクから、C10 と C11 の MDL は標準物質を添加した精製水の測定結果から算出した値を採用した。MDL 測定時のクロマトグラムを図 2-1、2-2 に示す。

表 4-1 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細) *1

物質名	C9	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)	操作 ブランク	サロゲート 回収率(%)
試料	精製水	-	-	精製水	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	20	-	-	0	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.20	-	-	0	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-
注入液濃度 (ng/mL)	2.0 +	-	-	-	-
装置注入量 (µL)	5	-	-	5	-
操作ブランク平均 (µg/L) *2	0.167	-	-	0.167	-
無添加平均 (µg/L) *3	0.167	-	-	0.167	-
結果 1 (µg/L)	0.325	79	91	0.242	55
結果 2 (µg/L)	0.323	78	91	0.148	56
結果 3 (µg/L)	0.318	76	94	0.143	70
結果 4 (µg/L)	0.325	79	95	0.153	87
結果 5 (µg/L)	0.352	93	70	0.164	58
結果 6 (µg/L)	0.365	99	75	0.135	75
結果 7 (µg/L)	0.343	88	81	0.181	77
平均値 (µg/L)	0.3359	84.7	85.2	0.1666	68.3
標準偏差 (σ_{n-1}) (µg/L)	0.0177			0.0365	-
MDL (µg/L) *4	0.069			0.14	-
MQL (µg/L) *5	0.18			0.37	-
S/N 比	29			15	-
CV(%)	5.5			22	-

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n = 7)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 7)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

表4-2 MDL 及びMQL の算出結果 (詳細) *1

物質名	C10	補正後回 収率(%)	サロゲート 回収率(%)	操作 ブランク	サロゲート 回収率(%)
試料	精製水	-	-	精製水	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	10	-	-	0	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.10	-	-	-	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-
注入液濃度 (ng/mL)	1.0+	-	-	-	-
装置注入量 (µL)	5	-	-	5	-
操作ブランク平均 (µg/L) *2	<0.028 (0.023)	-	-	0.023	-
無添加平均 (µg/L) *3	<0.028 (0.023)	-	-	0.023	-
結果 1 (µg/L)	0.115	93	90	0.0243	56
結果 2 (µg/L)	0.116	94	88	0.0251	71
結果 3 (µg/L)	0.110	88	93	0.0252	73
結果 4 (µg/L)	0.111	89	94	0.0164	78
結果 5 (µg/L)	0.111	90	71	0.0193	86
結果 6 (µg/L)	0.131	109	73	0.0219	55
結果 7 (µg/L)	0.111	90	79	0.0273	74
平均値 (µg/L)	0.1149	93.3	83.9	0.02280	70.3
標準偏差 (σ _{n-1}) (µg/L)	0.00733			0.00382	
MDL (µg/L) *4	0.028			0.015	
MQL (µg/L) *5	0.073			0.038	
S/N 比	29			12	
CV(%)	6.4			17	

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n = 7)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値
(n = 7)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

表4-3 MDL 及びMQL の算出結果 (詳細) *1

物質名	C11	補正後回 収率(%)	サロゲート 回収率(%)	操作 ブランク	サロゲート 回収率 (%)
試料	精製水	-	-	精製水	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	2.5	-	-	0	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.025	-	-	0	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.25+	-	-		-
装置注入量 (μL)	5	-	-	5	-
操作ブランク平均 (μg/L)*2	<0.013 (0.0041)	-	-	0.0041	-
無添加平均 (μg/L)*3	<0.013 (0.0041)	-	-	0.0041	-
結果 1 (μg/L)	0.0266	90	91	0.00419	55
結果 2 (μg/L)	0.0258	87	102	0.00378	70
結果 3 (μg/L)	0.0279	95	91	0.00441	74
結果 4 (μg/L)	0.0269	91	102	0.00421	77
結果 5 (μg/L)	0.0328	115	79	0.00404	86
結果 6 (μg/L)	0.0323	113	81	0.00394	74
結果 7 (μg/L)	0.0332	116	87	0.00437	77
平均値 (μg/L)	0.02934	101	90.2	0.004135	73.4
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00325			0.000229	
MDL (μg/L)*4	0.013			0.00089	
MQL (μg/L)*5	0.033			0.0023	
S/N 比	35			9.1	
CV(%)	11			5.5	

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n = 7)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値
(n = 7)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

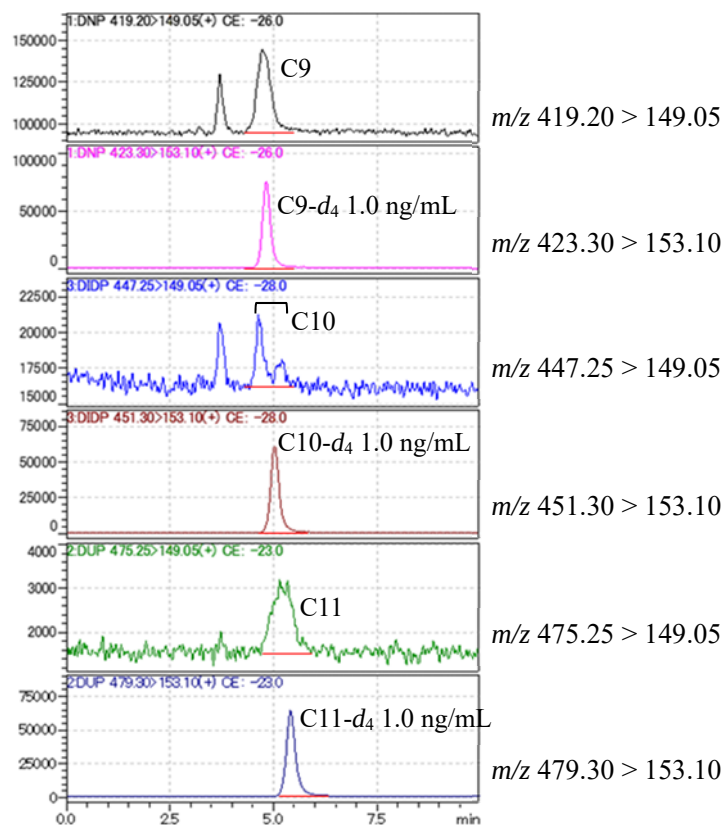


図 2-1 MDL 測定時のクロマトグラム（操作ブランク）

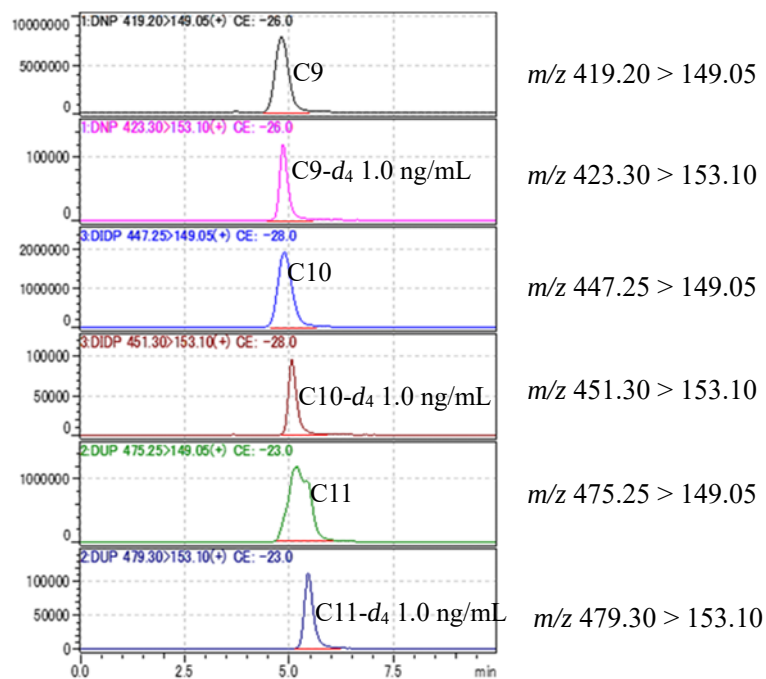


図 2-2 MDL 測定時のクロマトグラム（添加試料、C9 (2.0 ng/mL 分+操作ブランク)、C10 (1.0 ng/mL 分+操作ブランク)、C11 (0.25 ng/mL 分+操作ブランク)）

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

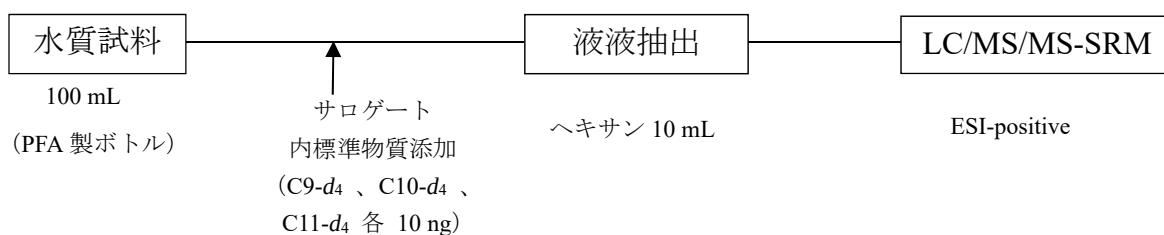


図3 分析法のフローチャート

【ブランク値低減】

図4-1、4-2は、本分析法の検討に当たって、実際に使用したものなどである。なお、内標準液用マイクロシリンジは、結果として50 μ L 容より100 μ L 容の方が適当であった。対象物質は使用頻度が高いプラスチック可塑剤であって、ほとんどあらゆるものがブランク値上昇の原因となりうる。使用できるのは、新品もしくはブランク値上昇の原因とはならないことを確認できたものだけである。いったん高濃度にさらされたものは、いくら洗浄してもブランクが消えないことがある。操作のすべての段階において、プラスチック製品を用いてはならず、パストゥールピペットを含め、ガラス製ピペット類は避ける。ヘキサンは超高純度のものを試薬瓶からPFA樹脂製洗瓶に移し入れて使用し、空気以外何にも接触させない。

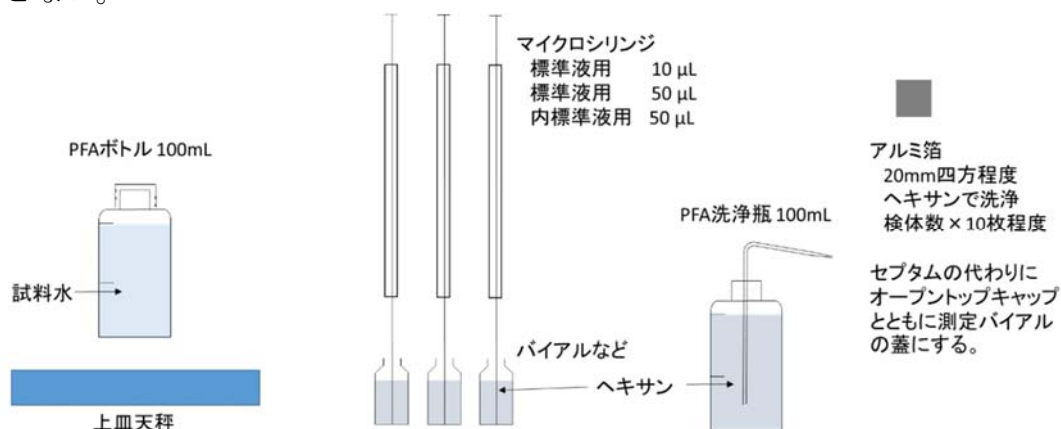


図4-1 事前に用意したもの

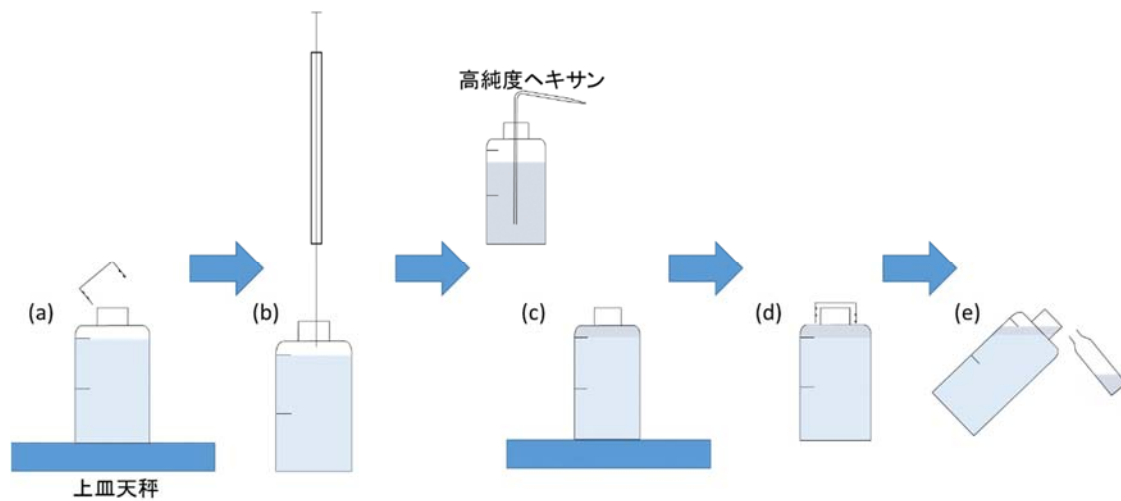


図 4-2 前処理手順

(a)容器ごと試料水の重量測定 (b)内標準液添加 (c)へキサン添加（添加量は重量制御） (d)蓋をして激しく振とう (e)容器を傾け、測定用バイアルに移し入れる。その後、測定値が確定したら、容器をカラにして重量測定し、試料水量を算出する。

〔検量線〕

検量線を図 5-1～5-3 に、検量線作成用データを表 5-1～5-3 に示す。

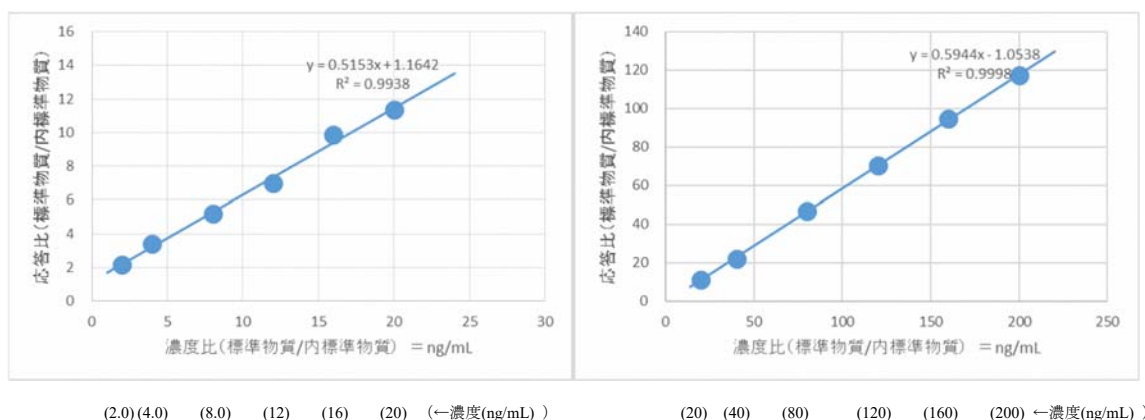


図 5-1 左図：低濃度域検量線(C9：2.0～20 ng/mL)

右図：高濃度域検量線 (C9：20～200 ng/mL) (サロゲート内標準(C9-d₄)濃度：1.0 ng/mL)

表 5-1 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		
		対象物質(As) C9 (m/z 419 > 149)	サロゲート 内標準物質(Ais) C9-d ₄ (m/z 423 > 153)	応答比 (As/Ais)
2.0	2.0	4253145	1976425	2.2
4.0	4.0	6553569	1913591	3.4
8.0	8.0	10404819	2009213	5.2
12	12	12168431	1742670	7.0
16	16	21298851	2161163	9.9
20	20	24819638	2189021	11.3
40	40	42858256	1963807	21.8
80	80	87579201	1872939	46.8
120	120	134730351	1920494	70.2
160	160	195569510	2063084	94.8
200	200	201325192	1716178	117

Cis*：サロゲート内標準物質濃度 1.0 ng/mL

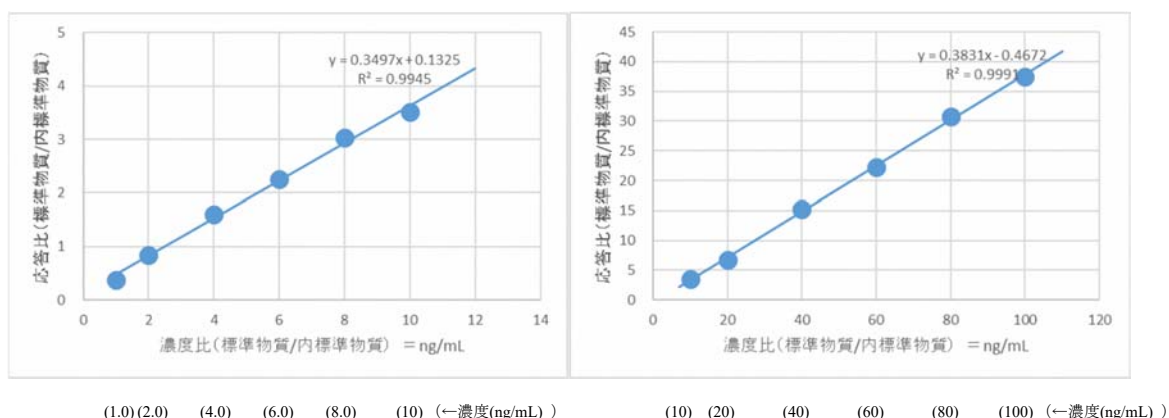


図 5-2 左図：低濃度域検量線(C10：1.0～10 ng/mL)

右図：高濃度域検量線 (C10：10～100 ng/mL) (サロゲート内標準(C10-d₄)濃度：1.0 ng/mL)

表 5-2 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		
		対象物質(As) C10 (m/z 447 > 149)	サロゲート 内標準物質(Ais) C10-d ₄ (m/z 451 > 153)	応答比 (As/Ais)
1.0	1.0	732198	1917450	0.38
2.0	2.0	1489686	1758441	0.85
4.0	4.0	2822479	1753806	1.6
6.0	6.0	3709044	1640894	2.3
8.0	8.0	5830456	1925933	3.0
10	10	7157867	2039385	3.5
20	20	12363966	1830055	6.8
40	40	26237906	1726430	15
60	60	40337864	1809955	22
80	80	62178446	2024329	31
100	100	76817545	2049082	37

Cis*：サロゲート内標準物質濃度 1.0 ng/mL

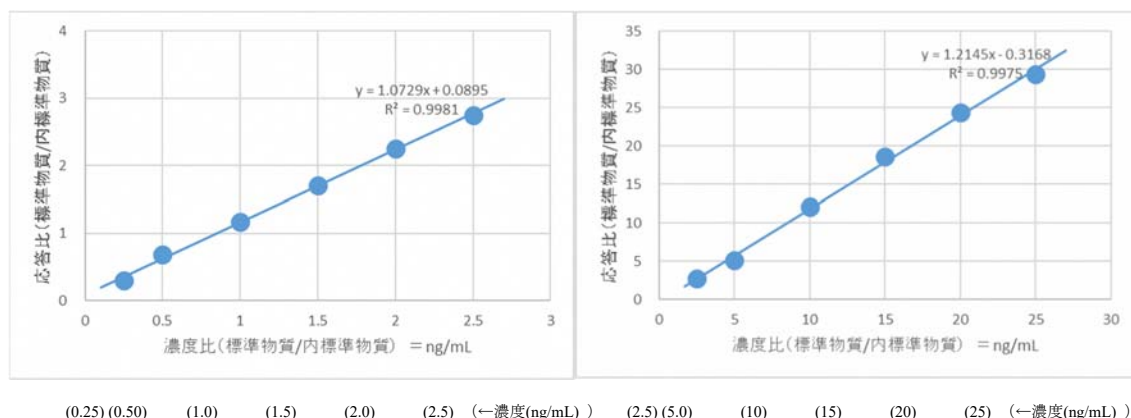


図5-3 左図：低濃度域検量線(C11：0.25～2.5 ng/mL)
右図：高濃度域検量線 (C11：2.5～25 ng/mL) (サロゲート内標準(C11-*d*₄)濃度：1.0 ng/mL)

表 5-3 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		
		対象物質(As) C11 (<i>m/z</i> 475 > 149)	サロゲート 内標準物質(Ais) C11- <i>d</i> ₄ (<i>m/z</i> 479 > 153)	応答比 (As/Ais)
0.25	0.25	516520	1752605	0.29
0.50	0.50	1256032	1822771	0.69
1.0	1.0	2182104	1869118	1.2
1.5	1.5	2843257	1672048	1.7
2.0	2.0	4508528	2005474	2.2
2.5	2.5	5995790	2178535	2.8
5.0	5.0	10453681	2032543	5.1
10	10	22498545	1869060	12
15	15	36738141	1979078	19
20	20	55807078	2293866	24
25	25	53271794	1811852	29

Cis *：サロゲート内標準物質濃度 1.0 ng/mL

〔クロマトグラム〕

標準液のクロマトグラムを図 6 に示す。

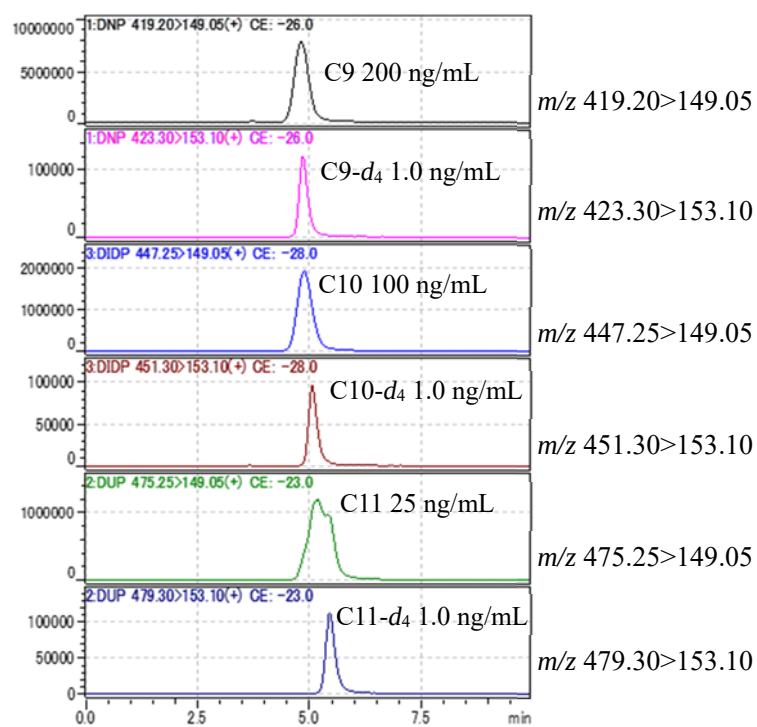


図 6 標準液のクロマトグラム

[マススペクトル]

標準物質のマススペクトルを図 7-1-1～7-3-4 に示す。

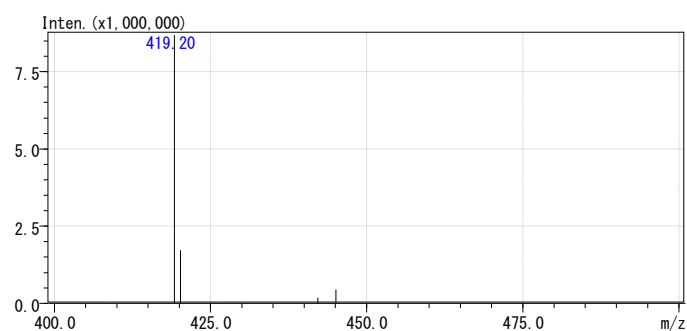


図 7-1-1 フタル酸ジノニル(MW = 418.6)のスキンスペクトル

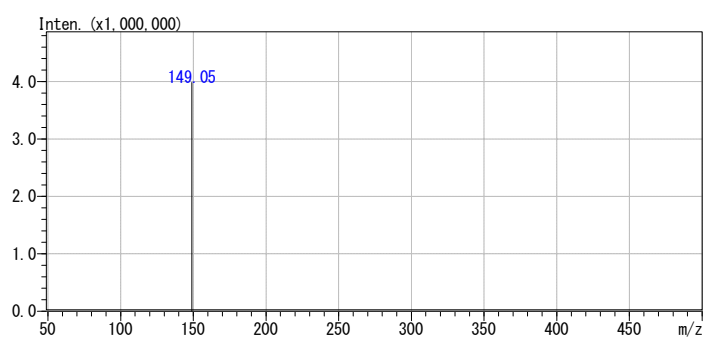


図 7-1-2 フタル酸ジノニルの m/z 419 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

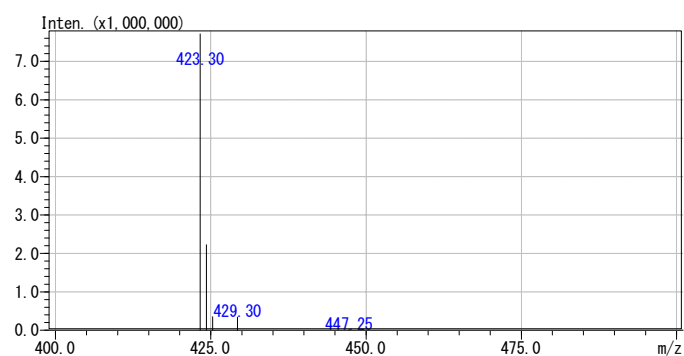


図 7-1-3 フタル酸ジノニル- d_4 (MW = 422.6)のスキンスペクトル

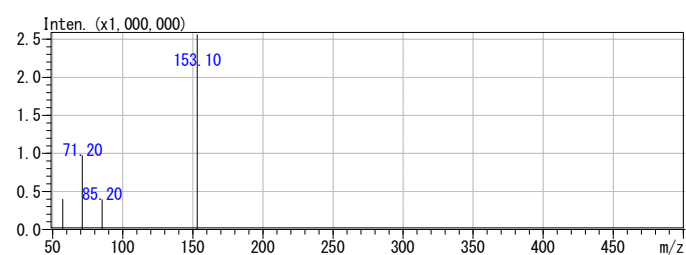


図 7-1-4 フタル酸ジニール- d_4 の m/z 423 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

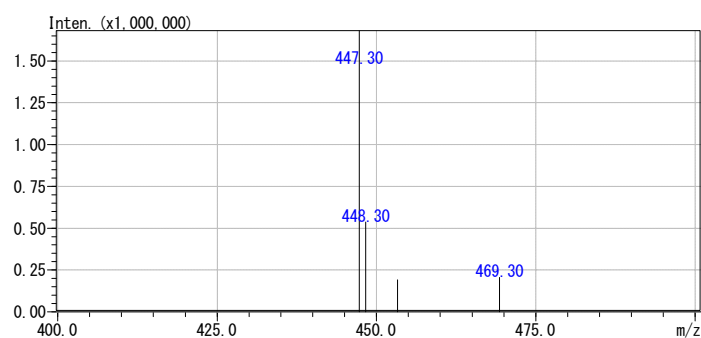


図 7-2-1 フタル酸ジイソデシル (MW=446.6)のスキャンスペクトル

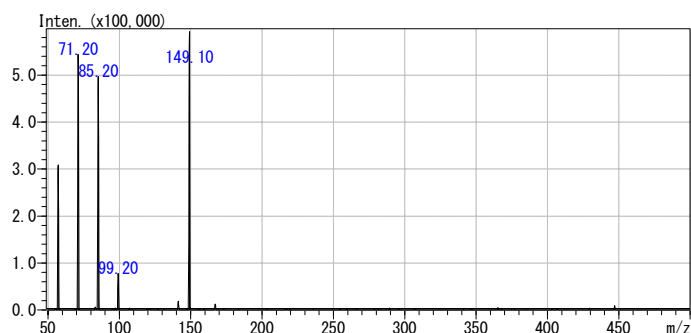


図 7-2-2 フタル酸ジイソデシルの m/z 447 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

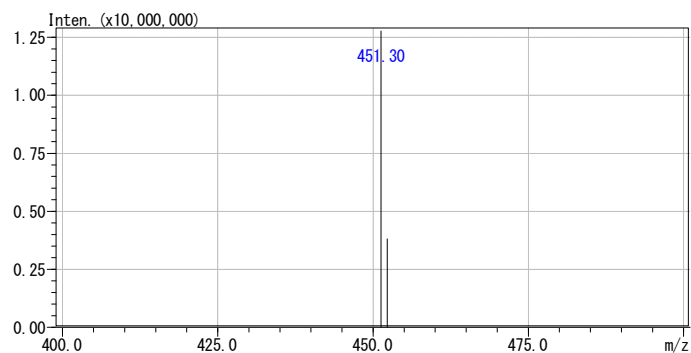


図 7-2-3 フタル酸ジイソデシル- d_4 (MW=450.6)のスキャンスペクトル

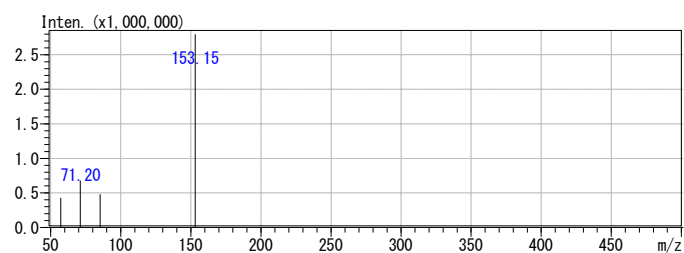


図 7-2-4 フタル酸ジイソデシル- d_4 の m/z 451 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

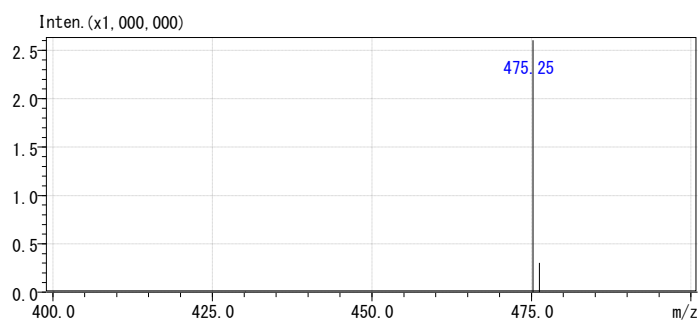


図 7-3-1 フタル酸ジウンデシル (MW=474.7) のスキャンスペクトル

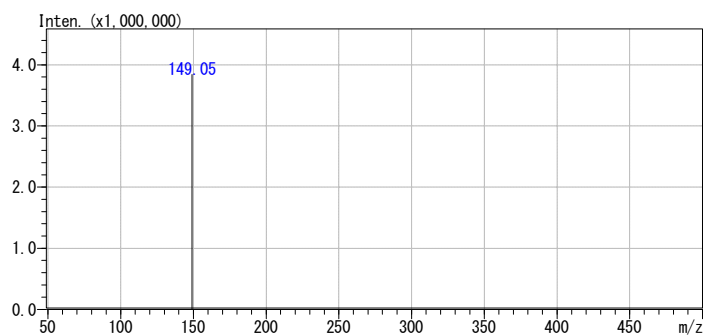


図 7-3-2 フタル酸ジウンデシルの m/z 475 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

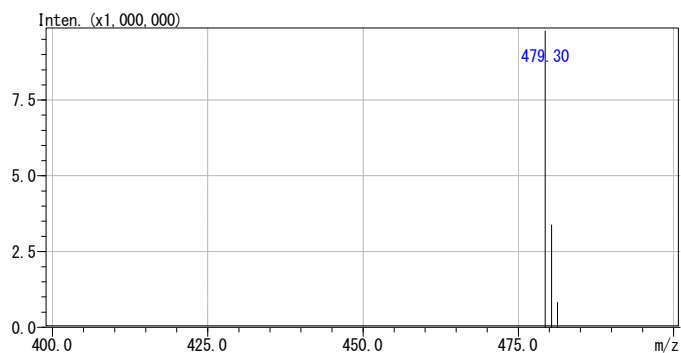


図 7-3-3 フタル酸ジウンデシル- d_4 (MW=478.6) のスキャンスペクトル

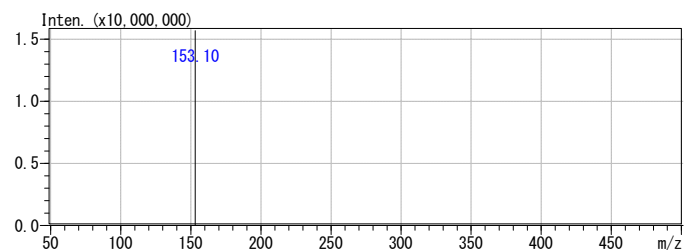


図 7-3-4 フタル酸ジウンデシル- d_4 の m/z 479 をプレカーサーイオンとした場合のタンデムスペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 8 に示す。図のように、いずれの物質もピークが見られたが、C10 と C11 は MDL 未満であった。ただ、C9 は特に、しばしば検量線範囲にかかるほどのピークが現れたので、器具類を汚染させないように、操作は慎重に行わなくてはならない。

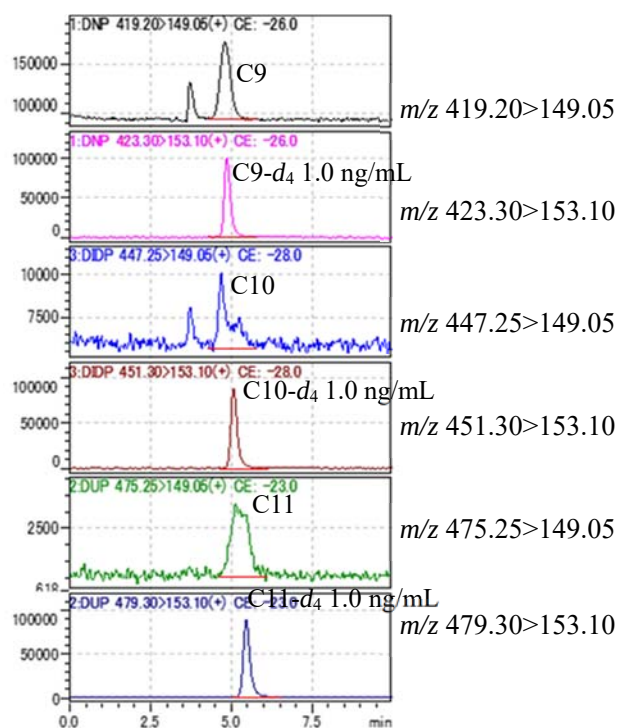


図 8 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

精製水、河川水（平作川）及び海水（東京湾）への添加回収試験の結果を表 6-1～6-3 に、クロマトグラムを図 9-1～9-4 に示す。対象物質は水溶解度が極めて低いので、添加量は溶解度を超えないよう注意した。回収率は良好であったが、ばらつきが大きい結果となった。無添加の試料にも対象物質のピークが見られるが、操作ブランクを差し引くと、すべて MDL 未満となった。

表 6-1 添加回収試験の結果(C9)

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度* (μg/L)	回収率* (%)	CV (%)	サロゲート内標準物質	
								回収率(%)	CV (%)
精製水	100	0	10	7	<0.14	-	-	93.7	5.3
	100	20	10	7	0.169	84.7	10	85.7	12
	100	80	10	2	0.726	90.8	-	93.1	-
河川水	100	0	10	2	<0.14	-	-	94.4	-
	100	80	10	5	1.00	116	13	94.4	12
海水	100	0	10	2	<0.14	-	-	72.4	-
	100	80	10	2	0.759	94.9	-	85.5	-

*: 検出濃度は、操作ブランクを差し引いた値。また検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

表 6-2 添加回収試験の結果(C10)

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度* (μg/L)	回収率* (%)	CV (%)	サロゲート内標準物質	
								回収率(%)	CV (%)
精製水	100	0	10	7	<0.028	-	-	83.6	9.2
	100	10	10	7	0.0933	93.3	7.9	83.9	11
	100	40	10	2	0.369	92.1	-	104	-
河川水	100	0	10	2	<0.028	-	-	101	-
	100	40	10	5	0.379	94.8	5.7	103	12
海水	100	0	10	2	<0.028	-	-	91.2	-
	100	40	10	2	0.391	97.8	-	106	-

*: 検出濃度は、操作ブランクを差し引いた値。また検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

表 6-3 添加回収試験の結果(C11)

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	最終 液量 (mL)	試験 数	検出 濃度* ($\mu\text{g/L}$)	回収率* (%)	CV (%)	サロゲート内標準物質	
								回収率(%)	CV (%)
精製水	100	0	10	7	<0.013	-	-	95.5	7.7
	100	2.5	10	7	0.0252	101	13	90.2	10
	100	10	10	2	0.0985	98.6	-	99.8	-
河川水	100	0	10	2	<0.013	-	-	100	-
	100	10	10	5	0.0952	95.2	12	101	12
海水	100	0	10	2	<0.013	-	-	84.4	-
	100	10	10	2	0.0969	96.9	-	96.6	-

*: 検出濃度は、操作ブランクを差し引いた値。また検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

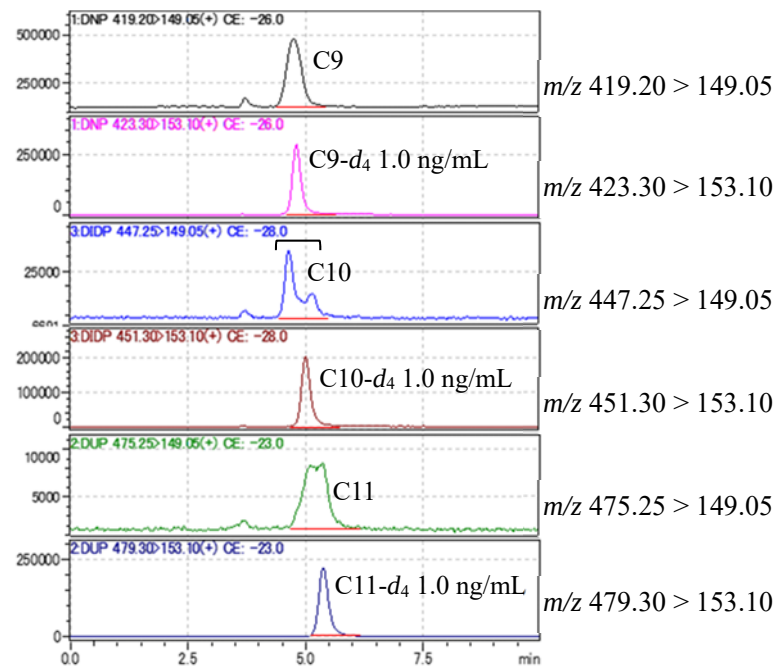


図 9-1 河川水のクロマトグラム（無添加、2020 年 1 月）

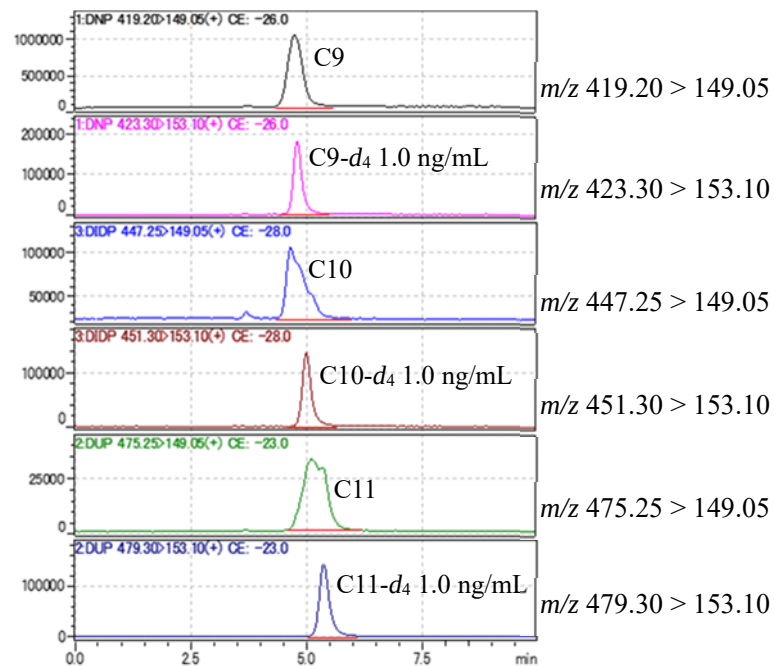


図 9-2 河川水のクロマトグラム（添加、C9:80 ng、C10:40 ng、C11:10 ng）

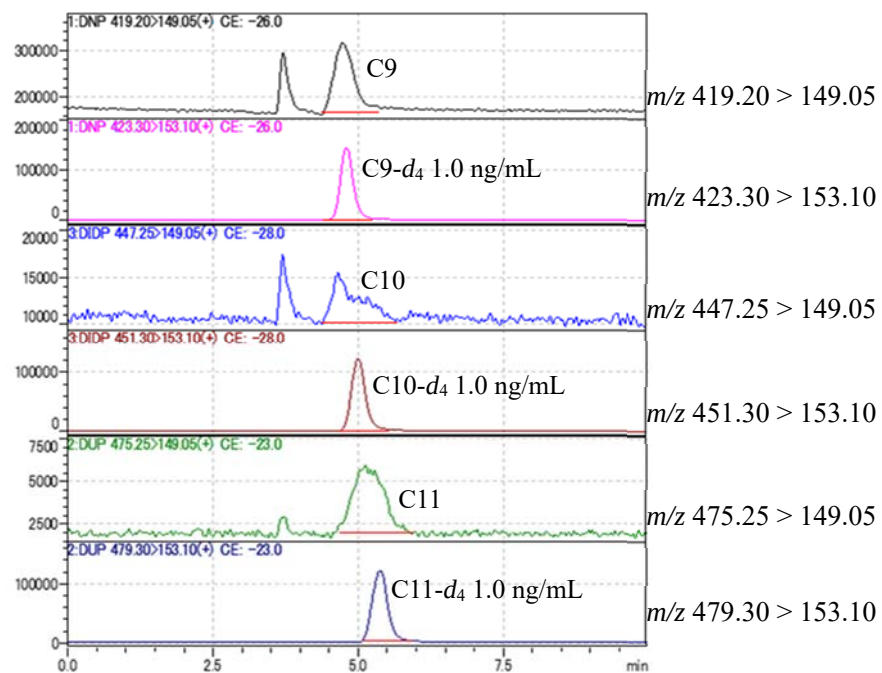


図 9-3 海水のクロマトグラム（無添加、2019 年 12 月）

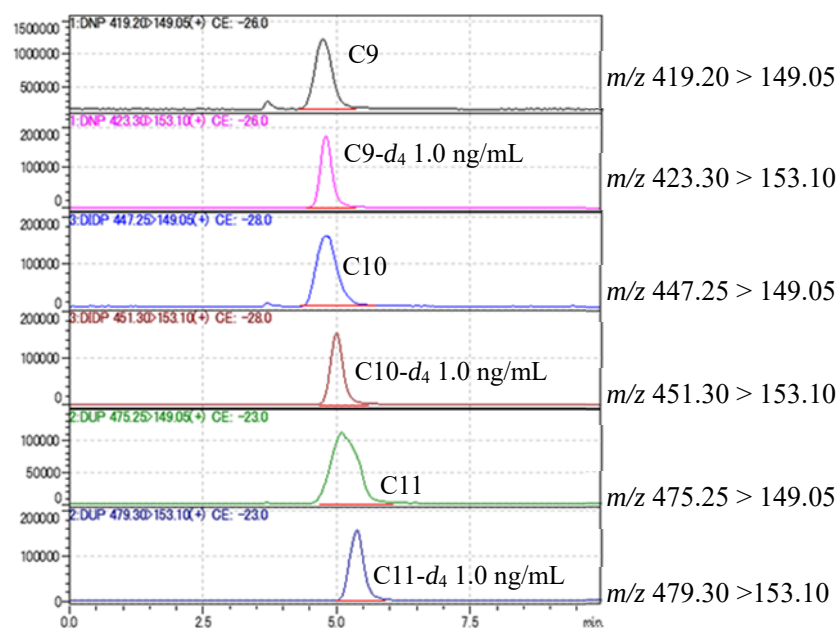


図 9-4 海水のクロマトグラム（添加、C9:80 ng、C10:40 ng、C11:10 ng）

〔分解性スクリーニング〕

分解性スクリーニングの結果を表 7 に示す。対象物質は水溶解度が極めて低いので、調製濃度は溶解度を超えないよう注意した。対象物質のうち、C9 はやや低下傾向が見られたが、この程度の pH や明るさは、顕著な影響を与えないと思われる。

表 7 分解性スクリーニングの結果

物質名	pH	試験数	調製濃度 (μg/L)	検出濃度(μg/L)（残存率 (%)*)		
				1 時間放置 後	7 日間放置後 暗所	7 日間放置後 明所
C9	5	2	0.80	0.88(110)	0.67(83.7)	
	7	2	0.80	0.83(104)	0.74(92.1)	0.68(84.8)
	9	2	0.80	0.82(102)	0.67(83.4)	
C10	5	2	0.25	0.26(104)	0.21(84.9)	
	7	2	0.25	0.25(100)	0.22(89.2)	0.28(114)
	9	2	0.25	0.24(96.0)	0.24(95.1)	
C11	5	2	0.060	0.058(97.4)	0.058(98.7)	
	7	2	0.060	0.061(101)	0.060(101)	0.069(115)
	9	2	0.060	0.061(102)	0.065(110)	

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

試料、試験液及び標準液の保存性試験結果を表 8-1～8-3 に示す。試料については【試料の採取及び保存】に示したように、対象物質を添加した水質試料を冷蔵庫保存した後、測定した。内標準液は、測定当日に添加した。対象物質は水溶解度が極めて低いので、調製濃度は溶解度を超えないよう注意した。試験液については、添加回収試験から得られた試験液を試料採取容器に入れたまま実験室に置き(20℃)、表 8-1～8-3 に記載した日数後に測定した。標準液については検量線用標準液を試験液と同様に扱い、測定した。なお、対象物質は汚染されやすいので、測定まで時間がかかる場合、試験液を測定バイアルに移さず、振とう後試料採取容器に入れたままにするとよい。

表 8-1 保存性試験結果(C9)

試料名	調製 濃度 (μg/L)	検出濃度(μg/L) (残存率(%)*)					
		当日	3 日間	7 日間	14 日間	1 ヶ月	
河川水	試料	0.80	0.95 (119)	0.74 (92.6)	-	0.71 (89.2)	-
	試験液	8.0	9.5 (119)	-	7.4 (92.4)	-	-
海水	試料	0.80	0.76 (94.9)	-	-	0.78 (98.0)	-
	試験液	8.0	7.6 (94.9)	-	6.7 (84.3)	-	-
標準液	MDL の 10 倍 程度	13	13 (100)	-	-	10 (82.4)	-
	検量線の最高 濃度	200	200 (100)	-	-	-	209 (104)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 8-2 保存性試験結果(C10)

試料名		調製 濃度 (μg/L)	検出濃度(μg/L) (残存率(%)*)				
			当 日	3 日 間	7 日 間	14 日 間	1 ヶ 月
河川水	試料	0.40	0.38 (94.8)	0.37 (93.4)	-	0.38 (94.2)	-
	試験液	4.0	3.8 (94.8)	-	3.9 (96.9)	-	-
海水	試料	0.40	0.39 (97.8)	-	-	0.47 (118)	-
	試験液	4.0	3.9 (97.8)	-	3.8 (94.5)	-	-
標準液	MDL の 10 倍 程度	4.3	4.3 (100)	-	-	4.3 (100)	-
	検量線の最高 濃度	100	100 (100)	-	-	-	99 (99.0)

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表 8-3 保存性試験結果(C11)

試料名	調製 濃度 (μg/L)	検出濃度(μg/L) (残存率(%)*)					
		当 日	3 日 間	7 日 間	14 日 間	1 ヶ 月	
河川水	試料	0.10	0.095 (95.2)	0.11 (109)	-	0.076 (75.6)	-
	試験液	1.0	0.95 (95.2)	-	0.92 (91.5)	-	-
海水	試料	0.10	0.097 (96.9)	-	-	0.11 (115)	-
	試験液	1.0	0.97 (96.9)	-	0.88 (87.7)	-	-
標準液	MDL の 10 倍 程度	0.89	0.89 (100)	-	-	0.88 (98.6)	-
	検量線の最高 濃度	25	25 (100)	-	-	-	23 (90.8)

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔カラムの選択〕

図 10 は、分離能の比較的高い ODS(C18)系のカラムで標準液を測定した例である。対象物質はアルキル鎖の分岐の違いにより、多数の異性体が混在した混合物であるが、C11 のように分離が中途半端でピークがいはびつだと、定量性が落ちる。また 3 物質とも d_4 体とピーク形状が異なり、異性体の混合割合が違うことがわかった。このため、本分析ではアルキル鎖の分岐の差が溶出時間の差となって表れにくく、 d_4 体ともピーク形状の差が表れにくい、分離能の比較的低い C4 系のカラムを用いた。

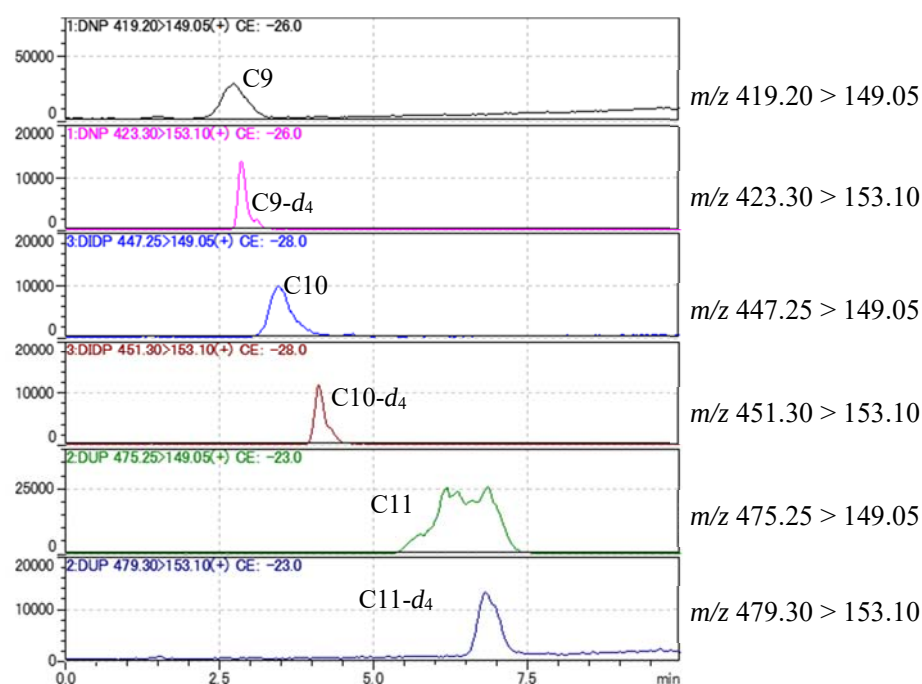


図 10 標準液の測定例（使用カラム：XBridge C18、50 mm×2.1 mm 3.5 μ m）
（各濃度 60 ng/mL、サロゲート内標準物質 10 ng/mL）

〔フタル酸ジイソオクチル(DIOP)同時分析の可能性〕

図 11 は、フタル酸ジイソノニル(DINP)などの測定に使用した C4 カラムより分離能が高い C8 カラム (XBridge C8, 2.5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm, 90%アセトニトリル 0.2 mL/min) を使って、フタル酸ジイソオクチルの標準液を測定したものである。いろいろなカラムを試みたが、モニターイオン(m/z 391>149)が共通である DEHP との分離は困難であった。またこのイオンをモニターするとベースラインが極めて高く、LC/MS システム自体が DEHP に汚染されているものと考えられた。DIOP の S/N が 10 を超えるのは、10 ng/mL 以上であった。20 ng/mL の標準液を繰り返し測定した場合、IDL は約 27 pg (換算値は約 0.5 μ g/L) であった。

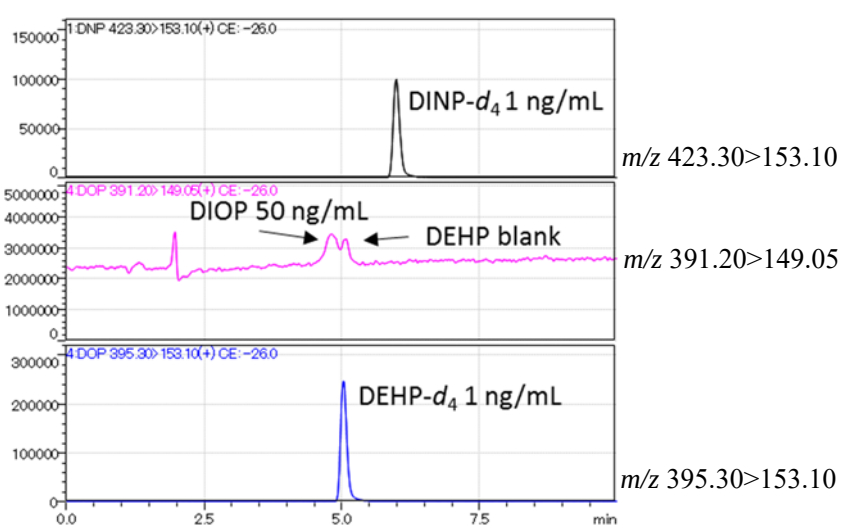


図 11 DIOP の標準液のクロマトグラム

〔環境試料の分析例〕

本法を用いて河川水 (平作川、図 9-1) 及び海水 (東京湾、図 9-3) を測定した。いずれも対象物質のピークが見られたが、操作ブランクを差し引くと MDL 未満であった。

【評価】

本分析法で用いた LC/MS/MS でのフタル酸エステル類の IDL は C9:1.5 pg (試料換算濃度は 0.031 µg/L)、C10:0.49 pg (試料換算濃度は 0.010 µg/L)、C11:0.074 pg (試料換算濃度は 0.0015 µg/L) であり、C9:2.0~200 ng/mL、C10:1.0~100 ng/mL、C11:0.25~25 ng/mL の範囲で検量線の直線性が確認された。MDL は C9:0.14 µg/L、C10:0.028 µg/L、C11:0.013 µg/L であった。河川水にフタル酸エステル類の標準物質を添加した際の回収率は、C9:116% (変動係数 13%)、C10:94.8% (同 5.7%)、C11:95.2% (同 12%) となった。本法で環境試料を分析した結果、神奈川県内の河川水 (平作川) および海水 (東京湾) からは、計算上すべて MDL 未満であったが、操作ブランクが高くピークは見られた。以上の結果から、本法は水質試料中に含まれる C9:0.1 µg/L、C10:0.03 µg/L、C11:0.01 µg/L 程度の対象物質の検出に適用できる。ただし、きわめて汚染を受けやすいので、測定操作はとくに注意深く行わなければならない。

【担当者連絡先】

所属先 : 神奈川県環境科学センター
所属先住所 : 〒254-0014 平塚市四之宮 1-3-39
TEL : 0463-24-3311 FAX : 0463-24-3300
担当者名 : 調査研究部 長谷川敦子
E-mail : hasegawa.j3i@pref.kanagawa.jp

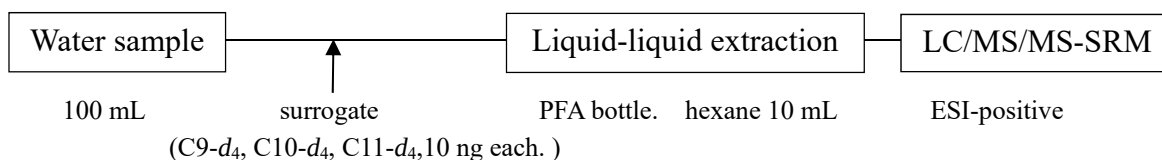
Dinonyl phthalate

Didecyl phthalate (Benzene-1,2-dicarboxylic acid diisodecyl)

Diundecyl phthalate (Benzene-1,2-diundecane-1-yl-phthalate)

An analytical method has been developed for the determination of dinonyl-phthalate (C9), didecyl-phthalate (benzene-1,2-dicarboxylic acid diisodecyl, (C10)), and diundecyl-phthalate (benzene-1,2-diundecane-1-yl-phthalate, (C11)) in water sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Ionization mode is positive ESI (electrospray ionization). Precursor ion is $[M+H]^+$, and the mass transitions of m/z 419 >149 (C9), m/z 447 >149 (C10) and m/z 475 >149 (C11) are used for detection of natives, respectively. Mixed internal standards (C9- d_4 , C10- d_4 and C11- d_4) are added to 100 mL of sample water in PFA bottle and the sample is extracted with 10 mL of hexane. After shaking the bottle, the analytes in hexane layer are determined by LC/MS/MS-SRM analysis.

The method detection limit (MDL) are 0.14 $\mu\text{g/L}$ (C9), 0.028 $\mu\text{g/L}$ (C10) and 0.013 $\mu\text{g/L}$ (C11), respectively. The method recoveries from river water and the relative standard deviation (RSD) were 116% and 13% (C9), 94.8% and 5.7% (C10), 95.2% and 12% (C11), respectively. Concentrations in river water at Kanagawa area were not determined (<MDL) by this method.



物質名	分析法フローチャート	備 考
[1]フタル酸ジノ ニル [2]ベンゼン-1,2- ジカルボン酸ジ イソデシル [3]ジウンデカン- 1-イル=フタラー ト IUPAC名： [1] Benzene-1,2-di -carboxylic acid-di -nonyl. [2] Benzene-1,2-di -carboxylic acid-di -decyl [3] Benzene-1,2-di -carboxylic acid-di -undecyl 別名： [1]フタル酸ジイ ソノニル [2]フタル酸ジイ ソデシル [3]フタル酸ジウ ンデシル	【水質】 <pre> graph TD A[水質試料 100 mL] --> B[液液抽出] B -- "サロゲート 内標準物質添加 (C9-d4、C10-d4、 C11-d4 各 10 ng)" --> A B -- "ヘキサン 10 mL" --> C[LC/MS/MS-SRM] C --> D[ESI-positive] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive 検出下限値： 【水質】(μg/L) [1] 0.14 [2] 0.028 [3] 0.013 分析条件： 機器 LC/MS： 島津製作所製 LCMS-8050 カラム 昭和電工製 shodex Asahipak C4P-50 4D 4.6 mm × 150 mm, 5 μm

フタル酸ジメチル

Dimethyl phthalate

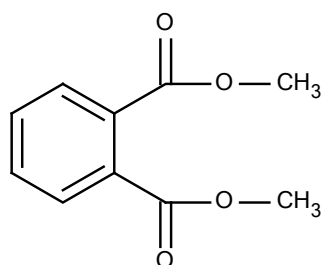
フタル酸ジエチル

Diethyl phthalate

フタル酸ジイソブチル

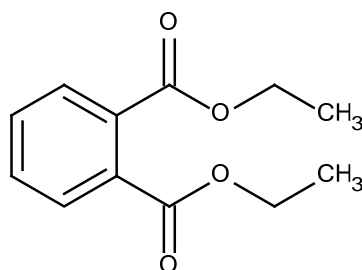
Diisobutyl phthalate

【対象物質の構造】



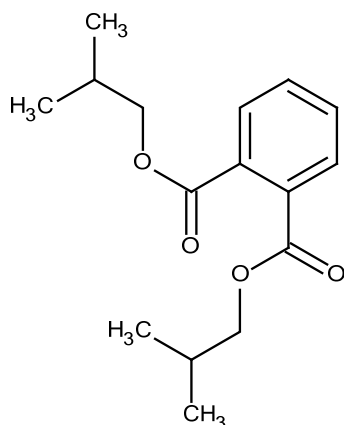
フタル酸ジメチル (DMP)

CAS 番号：131-11-3 分子式：C₁₀H₁₀O₄



フタル酸ジエチル(DEP)

CAS 番号：84-66-2 分子式：C₁₂H₁₄O₄



フタル酸ジイソブチル(DiBP)

CAS 番号：84-69-5 分子式：C₁₆H₂₂O₄

【物理化学的性状】

項目	DMP	DEP	DiBP
分子量	194.18	222.24	278.35
モライソトビツク質量	194.0579	222.0892	278.1518
融点(°C)	5.5 ^{1,2)}	-40.5 ^{6,7,8,9,10)}	-58 ¹³⁾ -64 ¹⁴⁾
沸点(°C)	283.7 ^{1,2)}	295 ^{6,7)} 296.1 ⁸⁾ 298 ^{6,10)}	296.5 ^{6,7)}
蒸気圧(Pa)	133 (20°C) ³⁾	0.22 (25°C) ⁷⁾ 0.28 (25°C) ¹¹⁾	0.0118 (20°C) ⁷⁾ 0.886 (25 °C) ¹⁵⁾
比重(g/mL)	1.192 (20°C) ⁴⁾	1.116-1.123 (20°C) ¹²⁾	1.049(15°C) ⁶⁾
水溶解度(g/L)	4 (20°C) ³⁾	1.08(25°C) ⁷⁾ 1.2(25°C) ⁸⁾ 1(25°C) ⁸⁾	0.0014(25°C) ¹⁶⁾ 0.0203(20°C) ^{7,17)}
log Pow	1.56 ⁵⁾	2.47 ⁷⁾	4.11 ^{7,17)}

【毒性、用途等】

〔毒性〕

DMP

急性毒性：経口 LD₅₀：6800 mg/kg ¹⁸⁾ (マウス)

環境影響：48h LC₅₀：33 mg/L ¹⁹⁾ (オオミジンコ)

96h LC₅₀ : 29 mg/L¹⁹⁾ (シーブスヘッドミノール)

DEP

急性毒性 : 経口 LD₅₀ : 6172 mg/kg (マウス)、8600 mg/kg (ラット)

8600 mg/kg²⁰⁾ (モルモット)

環境影響 : 48h EC₅₀ : 86 mg/L²⁰⁾ (オオミジンコ)

96h LC₅₀ : 1.2 mg/L²⁰⁾ (ニジマス)

DiBP

急性毒性 : 経口 LD₅₀ : > 5000 mg/kg²¹⁾ (ラット)

環境影響 : 48h EC₅₀ : 6.71mg/L²⁰⁾ (オオミジンコ)

96h LC₅₀ : 3.04 mg/L²⁰⁾ (メダカ)

〔用途〕

可塑剤、樹脂用添加剤

出典 :

- 1) 化学辞典, 東京化学同人(1994)
- 2) The Merck Index, 12th. Ed., Merck & Co., Inc.(1996)
- 3) Richardson, M.L. et.al., The Dictionary of Substances and their Effects, Royal Society of Chemistry(1992-1995)
- 4) 有機合成化学協会編, 有機化学物辞典, 講談社(1985)
- 5) 分配係数計算用プログラム “C Log P” , アダムネット (株)
- 6) LIDE, D.R., ed. (2002-2003) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 83rd ed., Boca Raton, London, New York, Washington DC, CRC Press, p. 3-39
- 7) HOWARD, P.H. and MEYLAN, W.M., ed. (1997) Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals, Boca Raton, New York, London, Tokyo, CRC Lewis Publishers, p.88
- 8) Yalkowsky, S.H. and HE, Y. (2003) Handbook of Aqueous Solubility Data, Boca Raton, London, New York, Washington DC, CRC Press, p.853
- 9) Lewis, R.J., Sr(Ed). Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 12th ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1993 396 [Hazardous Substances Data Bank]
- 10) Verschueren, K., ed.(1996) Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed., New York, Albany, Bonn, Boston, Detroit, London, Madrid, Melbourne, Mexico City, Paris, San Francisco, Singapore, Tokyo, Toronto, Van Nostrand Reinhold, p.777
- 11) Daniel A. Hinckley, Terry F. Bidleman, and William T. Foreman (1990) Determination of Vapor Pressures for Nonpolar and Semipolar Organic Compounds

- from Gas Chromatographic Retention Data. J. Chem. Eng. Data 35(3):232-237
- 12) 富士フイルム和光純薬 (2019) フタル酸ジエチル 安全データシート
- 13) STAPLES, C.A., ed. (2003) Phthalate Esters, The Handbook of Environmental Chemistry, Vol.3 Anthropogenic Compounds Part Q, Springer
- 14) Clayton, G. D. and F. E. Clayton (eds.). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology: Volume 2A, 2B, 2C: Toxicology. 3rd ed. New York: John Wiley Sons, 1981-1982. 2345. [Hazardous Substances Data Bank]
- 15) Daubert, T.E., R.P. Danner. Physical and Thermodynamic Properties of Pure Chemicals Data Compilation. Washington, D.C.: Taylor and Francis, 1989
- 16) DEFOE, D.L., HOLCOMBE, G.W., HAMMERMEISTER, D.E., BIESINGER, K.E. (1990) Solubility and Toxicity of Eight Phthalate Esters to Four Aquatic Organisms. Toxicology and Chemistry, 9: 623-636
- 17) LEYDER, F. and BOULANGER, P. (1983) Ultraviolet Absorption, Aqueous Solubility, and Octanol-Water Partition for Several Phthalates. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 30: 152-157
- 18) 富士フイルム和光純薬 (2018) フタル酸ジメチル 安全データシート
- 19) 環境省：化学物質の環境リスク評価結果 第1巻、平成14年3月
- 20) 環境省：化学物質の環境リスク評価結果 第3巻、平成16年9月
- 21) 富士フイルム和光純薬 (2019) フタル酸ジイソブチル 安全データシート

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準を添加し、固相カートリッジに通水、脱水後、アセトンで溶出する。溶出液にシリンジスパイク内標準を加え、GC/MS-SIMで定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

フタル酸ジメチル (DMP)	： 富士フイルム和光純薬製	試薬特級 (>98.0%)
フタル酸ジエチル (DEP)	： 富士フイルム和光純薬製	試薬特級 (>98.0%)
フタル酸ジイソブチル (DiBP)	： 富士フイルム和光純薬製	試薬一級 (>97.0%)
フタル酸ジメチル- d_4	： 富士フイルム和光純薬製	環境分析用 (>98.0%)

(DMP-*d*₄)

フタル酸ジエチル-*d*₄ : 関東化学製 環境分析用 (>98.0%)

(DEP-*d*₄)

フタル酸ジイソブチル-*d*₄ : 富士フイルム和光純薬製 環境分析用 (>98.0%)

(DiBP-*d*₄)

フェナントレン-*d*₁₀ : 富士フイルム和光純薬製 1 mg/mL (ヘキサン溶液)

アセトン (注 1) : 富士フイルム和光純薬製 残留農薬 PCB 試験用

固相カートリッジ : Waters 製 Oasis HLB Plus

精製水 : Milli-Q 水または市販のミネラルウォーター (注 2)

【標準液の調製】(注 3)

〔標準液〕

DMP 10.0 mg を正確に量り取り、アセトン 20 mL に溶解し、500 µg/mL の標準原液を調製する。DEP、DiBP についても同様の操作で標準原液を調製する。標準原液をアセトンで希釈混合し、0.50 µg/mL の混合標準液を調製する。

〔サロゲート内標準液〕

DMP-*d*₄ 10.0 mg を正確に量り取り、アセトン 20 mL に溶解し、500 µg/mL の標準原液を調製する。次いで DEP-*d*₄、DiBP-*d*₄ についても同様の操作でサロゲート内標準原液を調製する。

サロゲート内標準原液をアセトンで希釈混合し、0.50 µg/mL の混合サロゲート内標準液を調製する。

〔シリンジスパイク内標準液〕

市販のフェナントレン-*d*₁₀ (1 mg/mL、ヘキサン溶液) をシリンジスパイク内標準原液とする。これをアセトンで希釈し、5.0 µg/mL のシリンジスパイク内標準液を調製する。

〔検量線用標準液〕

混合標準液をアセトンで順次希釈し、1.0～25 ng/mL の濃度範囲の検量線用標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液には、サロゲート内標準液を 5.0 ng/mL、シリンジスパイク内標準液を 10 ng/mL となるよう添加する。

【器具】

ガラス製ビーカー、ガラス製メスシリンダー、マイクロシリンジ (注 4)、ホールピペット、シリコンゴムキャップ、標準試薬保存容器、ガラス製注射筒、

アスピレーター又は吸引用ポンプ、吸引瓶又は固相抽出用吸引マニホールド、オートサンプラー用ガラスバイアル(注5)、ガラス製目盛り付き共栓試験管、ステンレス製ピンセット、ニトリル手袋、アルミホイル、ステンレス製バケツ

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】(注3)

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成28年3月)の「試料の採取及び検体の調製等」に従って採取する。試料の採取は、ステンレス製のバケツ等を用い、プラスチック製品の使用は避ける。試料の容器はガラス製の栓付き細口瓶等の密栓可能なものとし、運搬時にフタがはずれることを防ぐため、必要に応じて試料採取後にアルミホイルを用いて上部を覆う。

【試料の前処理及び試験液の調製】(注3)

吸引瓶(吸引マニホールド)の上に注射筒および固相カートリッジを取り付け、アセトン 15 mL、精製水 10 mL を順次通してコンディショニングを行う(注6)²⁾。試料 100 mL に混合サロゲート内標準液(0.50 mg/L)を 50 µL 添加し、10~20 mL/min の速度で固相カートリッジに通水する。固相カートリッジに精製水 5 mL を通して洗浄後、アスピレーターで空気を吸引して(2.0~2.5 L/min)、30 分程度脱水・乾燥を行う(注7)。ガラス製注射筒に固相カートリッジを取り付け、目盛り付き試験管を固相カートリッジの下に置き、アセトン 5 mL で溶出する。溶出液にアセトンを加えて 5.0 mL に定容した後、シリンジスパイク内標準液(5.0 mg/L)を 10 µL 加える。十分に混合した後、オートサンプラー用バイアルに 1.0 mL 程度を採って試験液とする。

【空試験液の調製】(注3)

試料と同じ量の精製水(注2)を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔GCMS 条件〕

使用機種	: GCMS : 島津製作所 GCMS-QP2020
使用カラム	: Agilent製DB-5ms (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)
カラム温度	: 60°C (1 min) → 10°C/min → 150°C (0 min) → 5°C/min → 200°C (0 min) → 10°C/min → 280°C (5 min)
注入口温度	: 250°C

試料導入方法	: スプリットレス (パージ 1 min)
試料注入液量	: 1 μ L
キャリアーガス	: He 89.6 kPa (定圧) (注 8)
インターフェース温度	: 250°C
イオン源温度	: 200°C
イオン化電圧 (イオン化エネルギー)	: 70 V (eV)
検出モード	: SIM
モニターイオン	: DMP m/z 163.0 (定量用)、 m/z 194.0 (確認用)
	DEP m/z 149.0 (定量用)、 m/z 177.0 (確認用)
	DiBP m/z 149.0 (定量用)、 m/z 223.0 (確認用)
	DMP- d_4 m/z 167.0 (定量用)、 m/z 198.0 (確認用)
	DEP- d_4 m/z 153.0 (定量用)、 m/z 181.0 (確認用)
	DiBP- d_4 m/z 153.0 (定量用)、 m/z 227.0 (確認用)
	フェナントレン- d_{10} m/z 188.0

〔検量線〕

検量線用標準液 1 μ L を GC/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 1 μ L を GC/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準の濃度比及びピーク面積比から検量線により定量する。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度 C (μ g/L) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q/V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (μ g)

(= 添加したサロゲート内標準の濃度 (μ g/mL) $\times$ 添加するサロゲート内標準液の容量 (mL))

V : 試料量 (L)

本分析法に従った場合、次の数値を使用する。

$$Q = 0.025 \text{ (}\mu\text{g)}$$

(= 添加したサロゲート内標準の濃度 (0.50 $\mu\text{g/mL}$) $\times$ 添加するサロゲート内標準液の容量 (0.05 mL))

$$V = 0.10 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 0.25 \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析方法の IDL を表 1 に示す。

表 1 DMP、DEP、DiBP の IDL 算出結果				
物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算 ($\mu\text{g/L}$)
DMP	0.089	0.10	5.0	0.0045
DEP	0.20	0.10	5.0	0.0099
DiBP	0.19	0.10	5.0	0.0096

〔分析方法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) 〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す。

表 2 DMP、DEP、DiBP の MDL 及び MQL の算出結果					
物質名	試料	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
DMP	水質	0.10	5.0	0.011	0.027
DEP	水質	0.10	5.0	0.013	0.032
DiBP	水質	0.10	5.0	0.026	0.067

注 解

- (注 1) 対象物質が検出されなければ、他の規格、他社製品も使用可能である。
- (注 2) ここでは、イオン交換及び活性炭が付属した Milli-Q 用の QuantumTEX カートリッジで処理した Milli-Q Q-POD 水を用いた。ブランクは、精製水を基本とするが、実験室等の状況により、対象物質の混入が疑われ、GC/MS で測定した際にピークが検出される場合は、市販のミネラルウォーター（ボルヴィックなど）を試行する。
- (注 3) 試料採取や実験で使用するガラス器具類（注射筒、ビーカー、ピペット、試験管、オートサンプラー用バイアル等）は、アセトンで内面を洗浄し、乾燥したものを用いる。実験室の空気にもフタル酸エステルが含まれているおそれがあることから、ガラス器具のアセトン洗浄及び乾燥は、使用する当日にできるだけ使用直前に行うものとする。また、必要に応じて、実験台にアルミホイルを敷くなど、周囲からの汚染をできるだけ防いで実験操作を行う。なお、アセトン洗浄後の分析操作に際しては、素手で洗浄した器具等に触れることを避けて、ステンレス製のピンセット、又はニトリル製の手袋を用いる³⁾。
- (注 4) マイクロシリンジを使用する場合には、バリデーションされたものを用いることを基本とし、精度誤差 2%以下となることを担保しておくことが望ましい。
- (注 5) オートサンプラー用のガラスバイアルのセプタムは、フタル酸エステルのピークが検出される製品があるため、対象物質のピークが検出されない製品（National C5000-86W 等）を用いるか、セプタムを使わず、バイアルの口の部分をアルミホイルで覆い、測定を行う。
- (注 6) 固相カートリッジは、必ずアセトン及び精製水による洗浄、コンディショニングを行う。開封直後のカートリッジの場合、アセトン 5 mL で洗浄したところ、妨害ピークが認められなくなった。本方法では、カートリッジのロットや保管状態による差などを配慮し、コンディショニングで用いるアセトンの容量を 15 mL とした。なお、コンディショニングで使用するアセトンや精製水は、ホールピペットによる正確な容量とする必要はなく、メスシリンダーや目盛り付き試験管等を用いた容量で差し支えない（実験操作中の安全ピペッター等の合成樹脂製品の使用はできるだけ避ける）。
- (注 7) 脱水中に室内空気からの汚染が懸念される場合は、カートリッジの先に室内大気からの汚染防止用にあらかじめアセトン洗浄し、乾燥した別の固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)をつける。カートリッジの脱水は、通

気前後でカートリッジの重量を測定して確認する。

- (注 8) GC 注入部のセプタムは、ローブリードタイプとし、セプタムやインサートを交換する際は、交換するセプタム、インサートを 280℃ で 1 時間程度処理してから、装置に取り付ける。また、分離の改善などでカラム先端を切断した場合は、カラムの長さに応じて、ヘッド圧を調整する。

(注 9) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

対象物質名	DMP	DEP	DiBP
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	5.0	5.0	5.0
注入液濃度 (ng/mL)	1.0	1.0	1.0
注入量 (pg)	1.0	1.0	1.0
装置注入液量 (μL)	1.0	1.0	1.0
結果 1 (pg)	0.999	1.04	1.00
結果 2 (pg)	1.00	0.976	1.01
結果 3 (pg)	1.01	0.991	1.11
結果 4 (pg)	1.01	0.899	1.12
結果 5 (pg)	1.06	1.02	1.09
結果 6 (pg)	1.05	0.991	1.06
結果 7 (pg)	1.02	1.05	1.10
平均値 (pg)	1.022	0.9959	1.070
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.0229	0.0510	0.0495
IDL (pg) *	0.089	0.20	0.19
IDL 試料換算 (μg/L)	0.0045	0.0099	0.0096
S/N 比	20	17	10
CV (%)	2.2	5.1	4.6

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

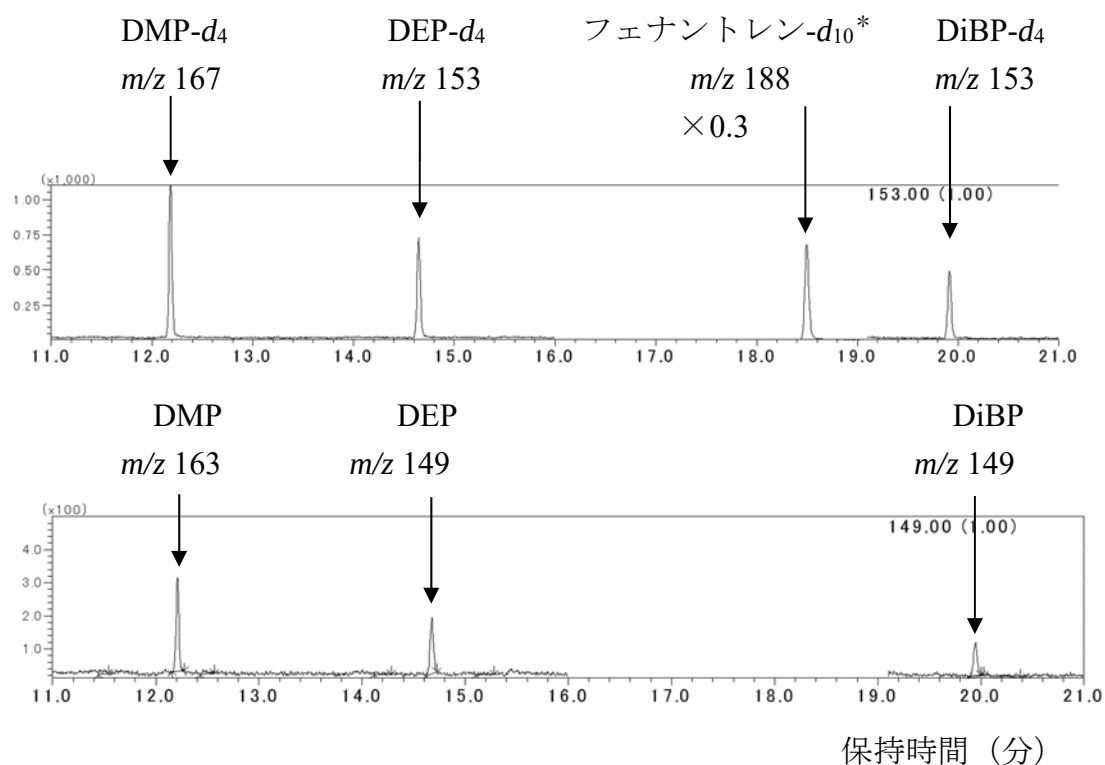


図1 IDL 測定時のクロマトグラム

*ピークを見やすく表示するため、クロマトグラムをサロゲート物質と対象物質で2段に分けている。また、フェナントレン-*d*₁₀の強度は、フタル酸エステルのサロゲートより大きいため×0.3としている（クロマトグラムについて、以下同様）。

(注 10) 横浜市内の海水（宝運河）に DMP、DEP、DiBP を添加して MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って、表 4 のとおり算出した。また、MDL 測定時のクロマトグラムを図 2、図 3 に示す。

表 4-1 MDL の算出結果 (DMP) (詳細) *1

物質名	DMP	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	海水	-	-
試料量(L)	0.10	-	-
標準添加量(ng)	5.0	-	-
試料換算濃度(μg/L)	0.050	-	-
最終液量(mL)	5.0	-	-
注入濃度(μg/L)	1.0	-	-
装置注入量(μL)	1.0	-	-
操作ブランク平均 (μg/L) *2	<0.011	-	102
無添加平均 (μg/L) *3	<0.011	-	100
結果 1 (μg/L)	0.0592	104	99
結果 2 (μg/L)	0.0583	102	95
結果 3 (μg/L)	0.0580	101	98
結果 4 (μg/L)	0.0569	99	109
結果 5 (μg/L)	0.0625	110	95
結果 6 (μg/L)	0.0647	115	100
結果 7 (μg/L)	0.0606	106	95
平均値 (μg/L)	0.06001	105	99
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00275		
MDL (μg/L) *4	0.011		
MQL (μg/L) *5	0.027		
S/N 比	20		
CV(%)	4.6		

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加しない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

表 4-2 MDL の算出結果 (DEP) (詳細) *1

物質名	DEP	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	海水	-	-
試料量(L)	0.10	-	-
標準添加量(ng)	5.0	-	-
試料換算濃度(μg/L)	0.050	-	-
最終液量(mL)	5.0	-	-
注入濃度(μg/L)	1.0	-	-
装置注入量(μL)	1.0	-	-
操作ブランク平均 (μg/L) *2	<0.013	-	102
無添加平均 (μg/L) *3	<0.013	-	103
結果 1 (μg/L)	0.0614	100	102
結果 2 (μg/L)	0.0604	98	98
結果 3 (μg/L)	0.0637	105	99
結果 4 (μg/L)	0.0672	112	113
結果 5 (μg/L)	0.0649	108	101
結果 6 (μg/L)	0.0690	116	101
結果 7 (μg/L)	0.0676	113	99
平均値 (μg/L)	0.06489	107	102
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00325		
MDL (μg/L) *4	0.013		
MQL (μg/L) *5	0.032		
S/N 比	19		
CV(%)	5.0		

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加しない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

表 4-3 MDL の算出結果 (DiBP) (詳細) *1

物質名	DiBP	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	海水	-	-
試料量(L)	0.10	-	-
標準添加量(ng)	5.0	-	-
試料換算濃度(μg/L)	0.050	-	-
最終液量(mL)	5.0	-	-
注入濃度(μg/L)	1.0	-	-
装置注入量(μL)	1.0	-	-
操作ブランク平均 (μg/L) *2	<0.026	-	92
無添加平均 (μg/L) *3	<0.026	-	92
結果 1 (μg/L)	0.0626	86	94
結果 2 (μg/L)	0.0676	96	90
結果 3 (μg/L)	0.0618	84	92
結果 4 (μg/L)	0.0712	103	102
結果 5 (μg/L)	0.0685	98	97
結果 6 (μg/L)	0.0774	115	93
結果 7 (μg/L)	0.0790	119	99
平均値 (μg/L)	0.06973	100	95
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.00668		
MDL (μg/L) *4	0.026		
MQL (μg/L) *5	0.067		
S/N 比	20		
CV(%)	9.6		

*1:定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2:空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*3:MDL 算出用試料に標準を添加しない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*4:MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5:MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

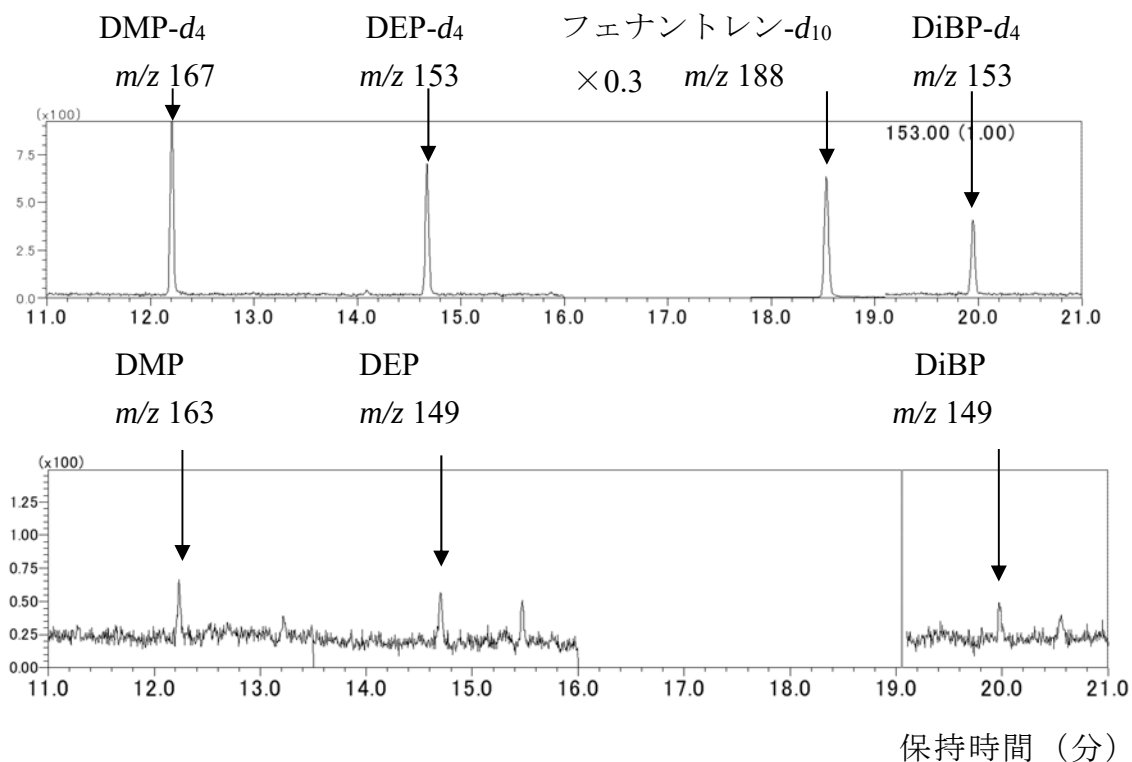


図2 無添加試料（海水）のクロマトグラム

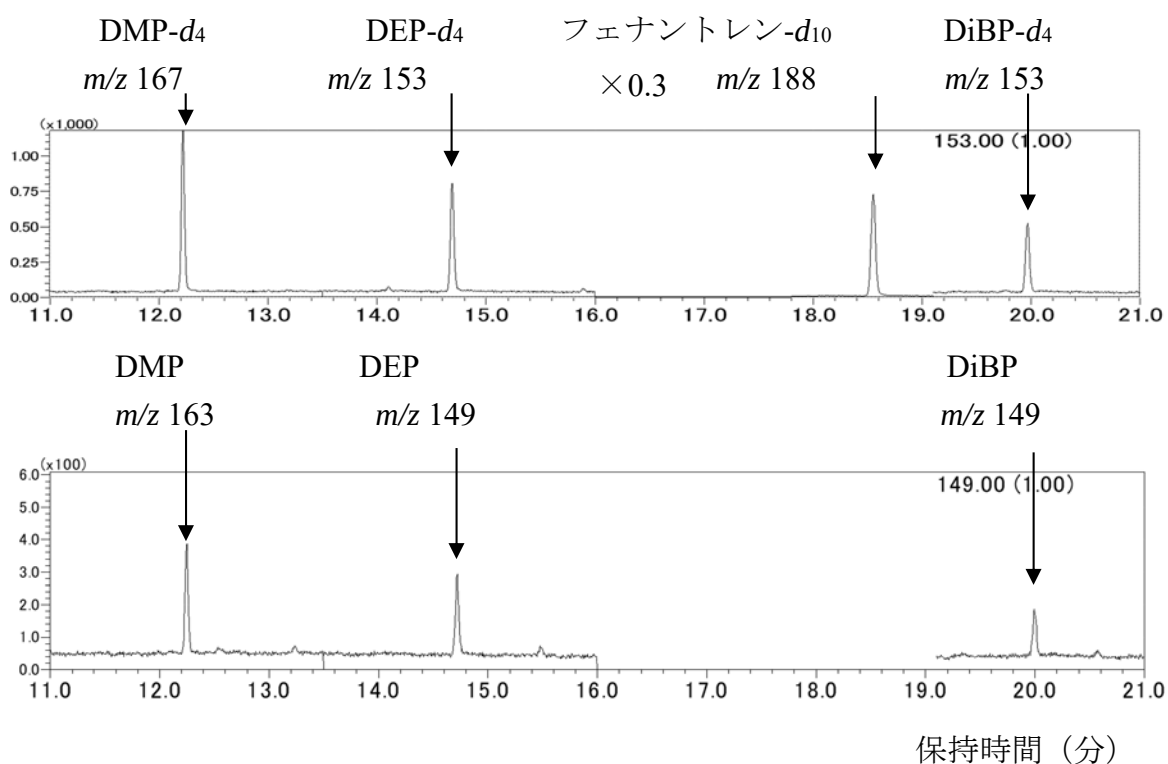


図3 MDL 測定時のクロマトグラム

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図4に示す。

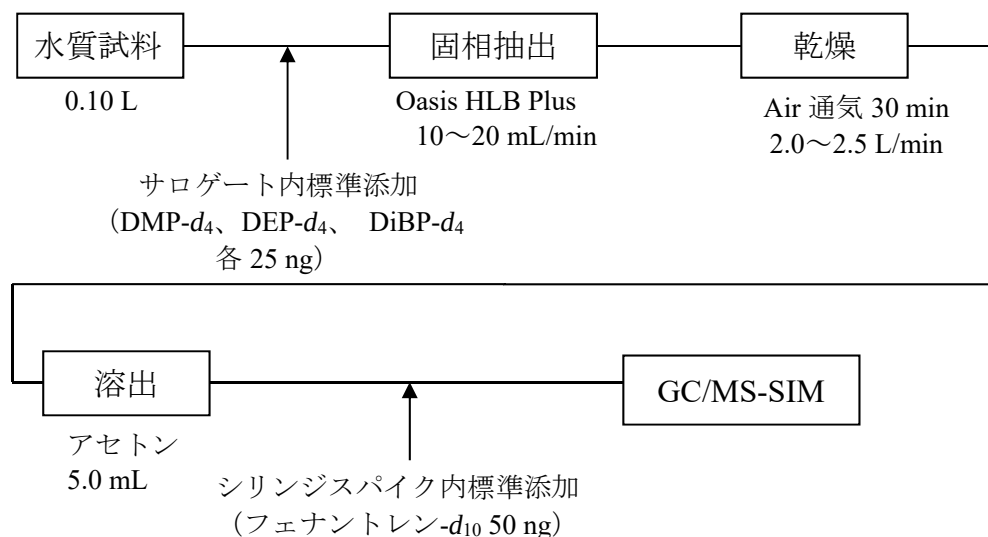


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

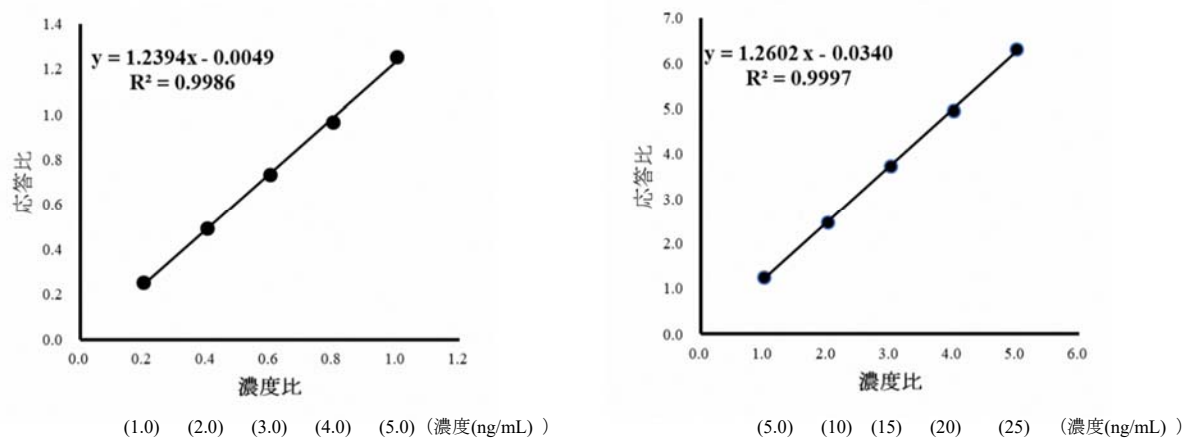
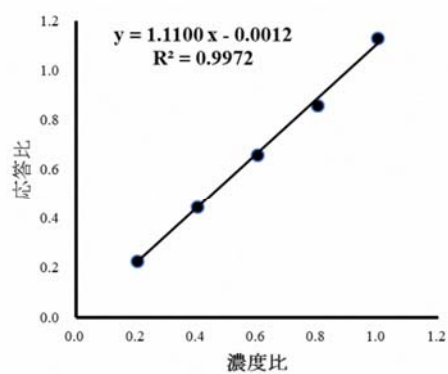
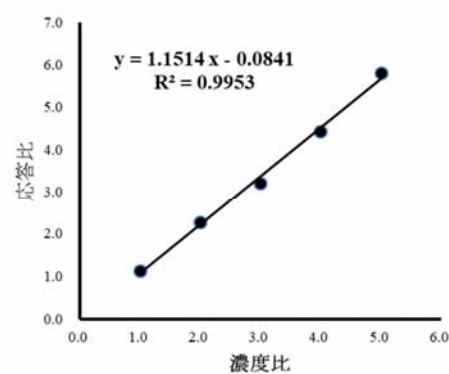


図5 DMP の検量線

左図：低濃度領域 1.0~5.0 ng/mL、右図：高濃度領域 5.0~25 ng/mL
(サロゲート内標準物質 5.0 ng/mL)



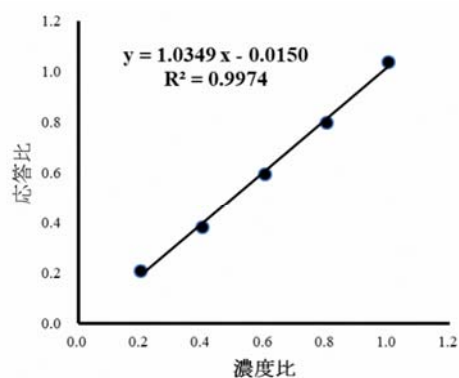
(1.0) (2.0) (3.0) (4.0) (5.0) (濃度(ng/mL))



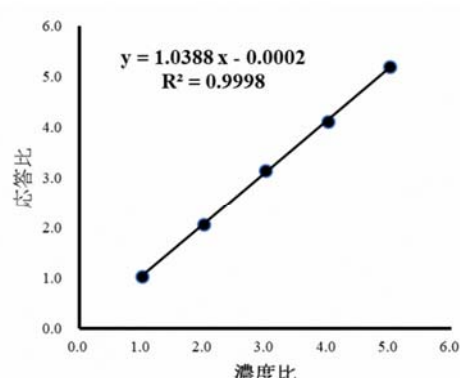
(5.0) (10) (15) (20) (25) (濃度(ng/mL))

図6 DEPの検量線

左図：低濃度領域 1.0～5.0 ng/mL、右図：高濃度領域 5.0～25 ng/mL
(サロゲート内標準物質 5.0 ng/mL)



(1.0) (2.0) (3.0) (4.0) (5.0) (濃度(ng/mL))



(5.0) (10) (15) (20) (25) (濃度(ng/mL))

図7 DiBPの検量線

左図：低濃度領域 1.0 ～ 5.0 ng/mL、右図：高濃度領域 5.0 ～ 25 ng/mL
(サロゲート内標準物質 5.0 ng/mL)

表 5 検量線作成用データ(DMP)

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質 (As) 【DMP】	サロゲート 内標準(Ais) 【DMP-d ₄ 】	
		(m/z 163.0)	(m/z 167.0)	
0.20	1.0	533	2126	0.251
0.40	2.0	1002	2038	0.492
0.60	3.0	1585	2164	0.732
0.80	4.0	1998	2069	0.966
1.0	5.0	2565	2047	1.253
2.0	10	4648	1880	2.472
3.0	15	7182	1922	3.737
4.0	20	8936	1801	4.962
5.0	25	11067	1754	6.310

サロゲート内標準物質濃度：5.0 ng/mL

表 6 検量線作成用のデータ(DEP)

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質 (As) 【DEP】	サロゲート 内標準(Ais) 【DEP-d ₄ 】	
		(m/z 149.0)	(m/z 153.0)	
0.20	1.0	366	1616	0.226
0.40	2.0	651	1455	0.447
0.60	3.0	977	1479	0.661
0.80	4.0	1243	1448	0.858
1.0	5.0	1701	1504	1.131
2.0	10	2986	1313	2.274
3.0	15	4643	1448	3.206
4.0	20	5932	1340	4.427
5.0	25	7154	1231	5.812

サロゲート内標準物質濃度：5.0 ng/mL

表 7 検量線作成用のデータ(DiBP)

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質 (As)	サロゲート 内標準(Ais)	
		【DiBP】 (m/z 149.0)	【DiBP- <i>d</i> ₄ 】 (m/z 153.0)	
0.20	1.0	232	1102	0.211
0.40	2.0	418	1087	0.385
0.60	3.0	649	1088	0.597
0.80	4.0	839	1048	0.801
1.0	5.0	1081	1042	1.037
2.0	10	2022	978	2.067
3.0	15	3111	988	3.149
4.0	20	3865	937	4.125
5.0	25	4641	892	5.203

サロゲート内標準物質濃度：5.0 ng/mL

〔クロマトグラム〕

混合標準液のクロマトグラムを図 8 に示す。

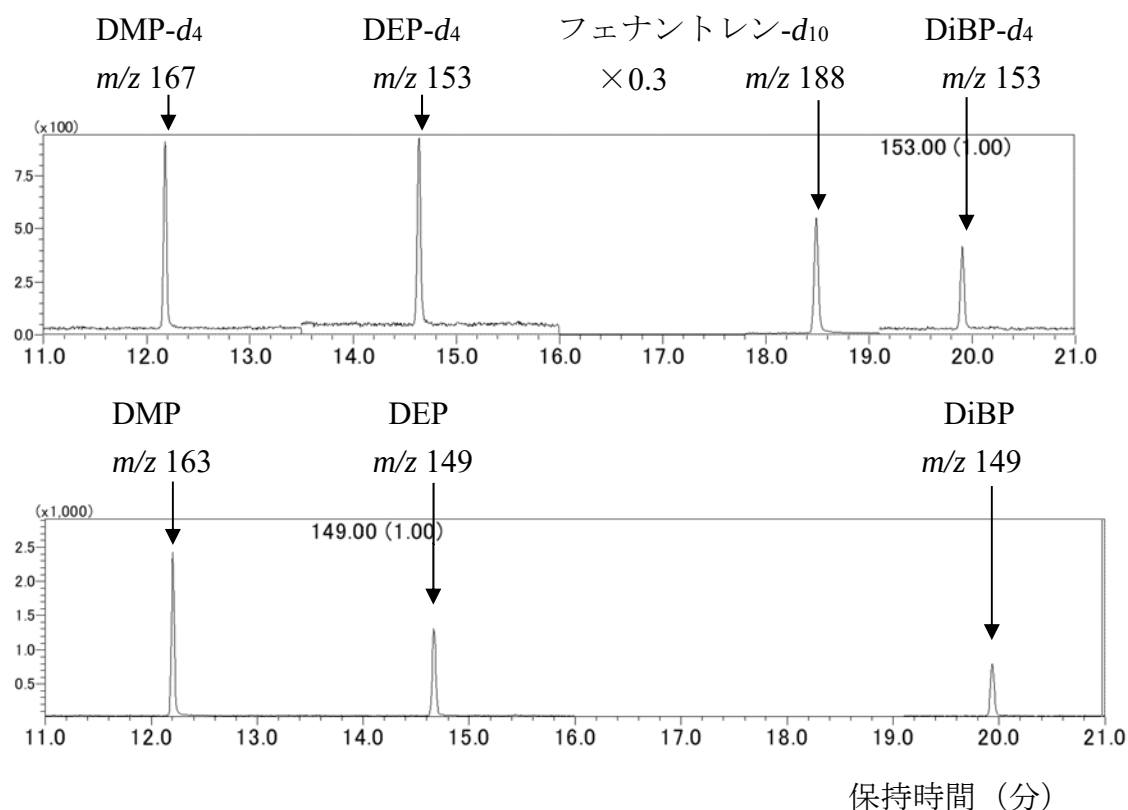


図 8 フタル酸エステル標準液のクロマトグラム

(DMP, DEP, DiBP : 各 10 ng/mL、DMP-d₄, DEP-d₄, DiBP-d₄ : 各 5.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

標準液(0.50 µg/mL)を、スキャンモードで測定を行った結果、以下のマススペクトルとなった。DMP、DEP、DiBP のマススペクトルを装置付属のライブラリーと比較したところ、いずれも高い類似度であった。

(1) DMP

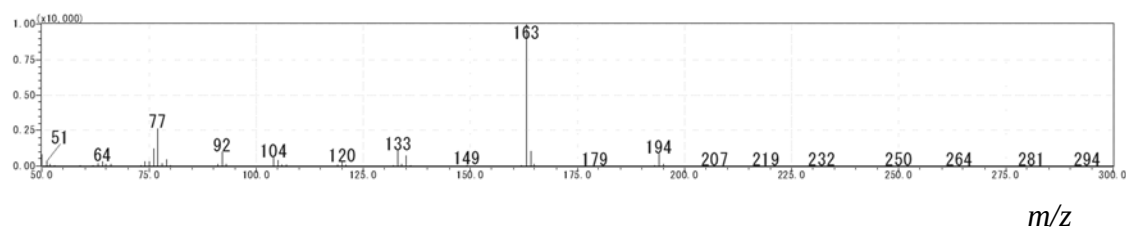


図 9 DMP のマススペクトル

(2) DEP

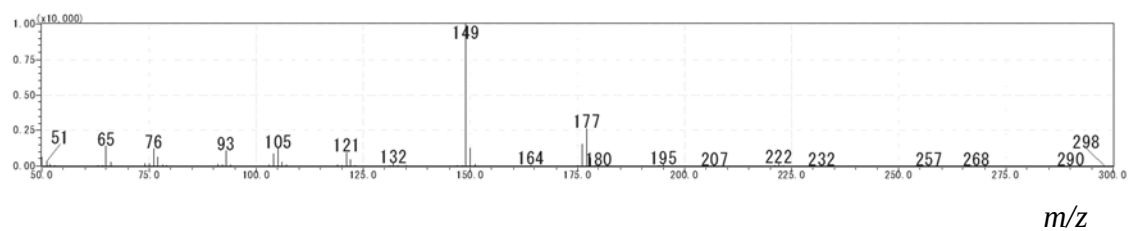


図 10 DEP のマススペクトル

(3) DiBP

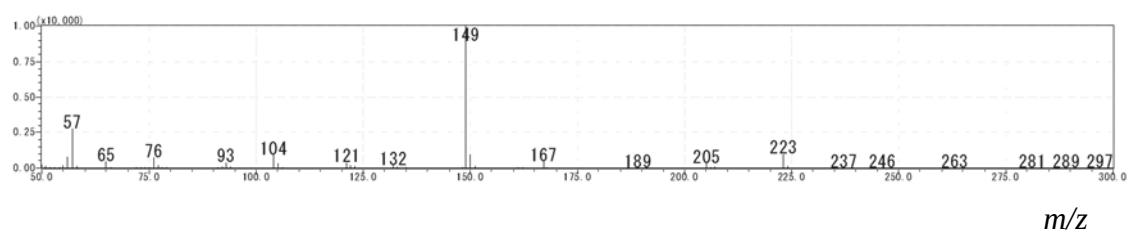


図 11 DiBP のマススペクトル

(4) DMP- d_4

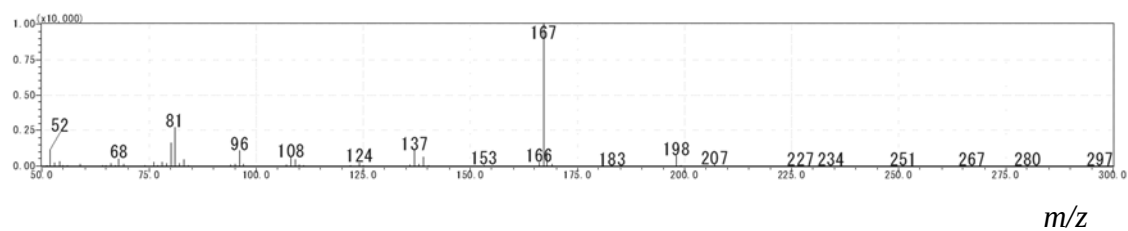


図 12 DMP- d_4 のマススペクトル

(5) DEP- d_4

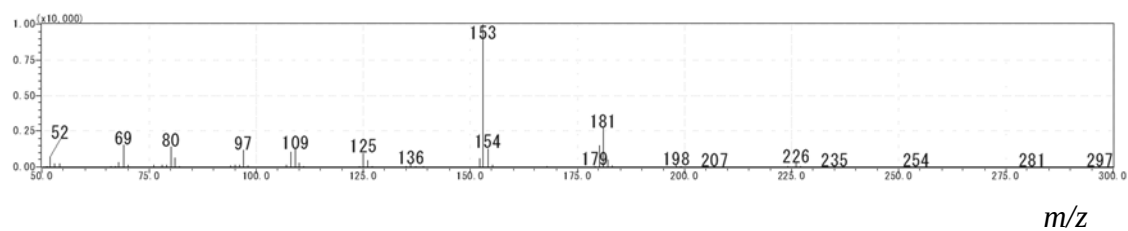


図 13 DEP- d_4 のマススペクトル

(6) DiBP- d_4

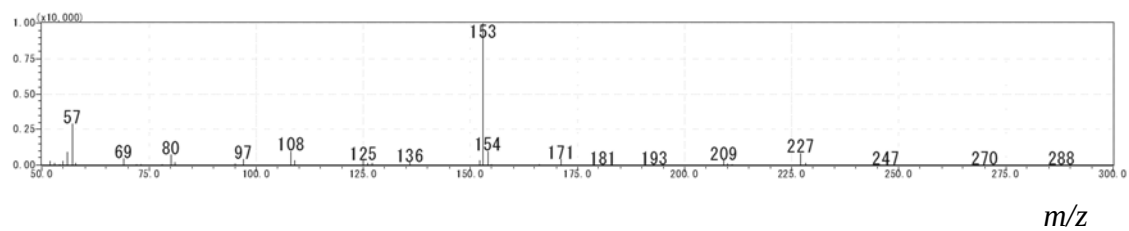


図 14 DiBP- d_4 のマススペクトル

(7) フェナントレン- d_{10}

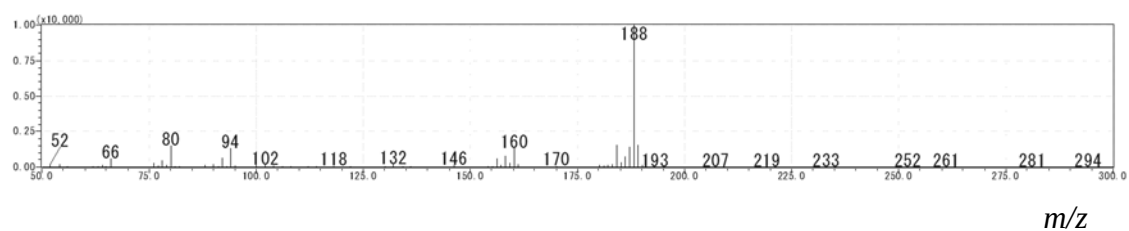


図 15 フェナントレン- d_{10} のマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

精製水（Milli-Q 水、ミネラルウォーター）を用いて、試料と同様に前処理を行い、分析した結果のクロマトグラムを図 16（Milli-Q 水）、図 17（ミネラルウォーター）に示した。Milli-Q 水、ミネラルウォーターのいずれの場合も、DMP、DEP、DiBP のピークは小さく、MDL 未満であった。

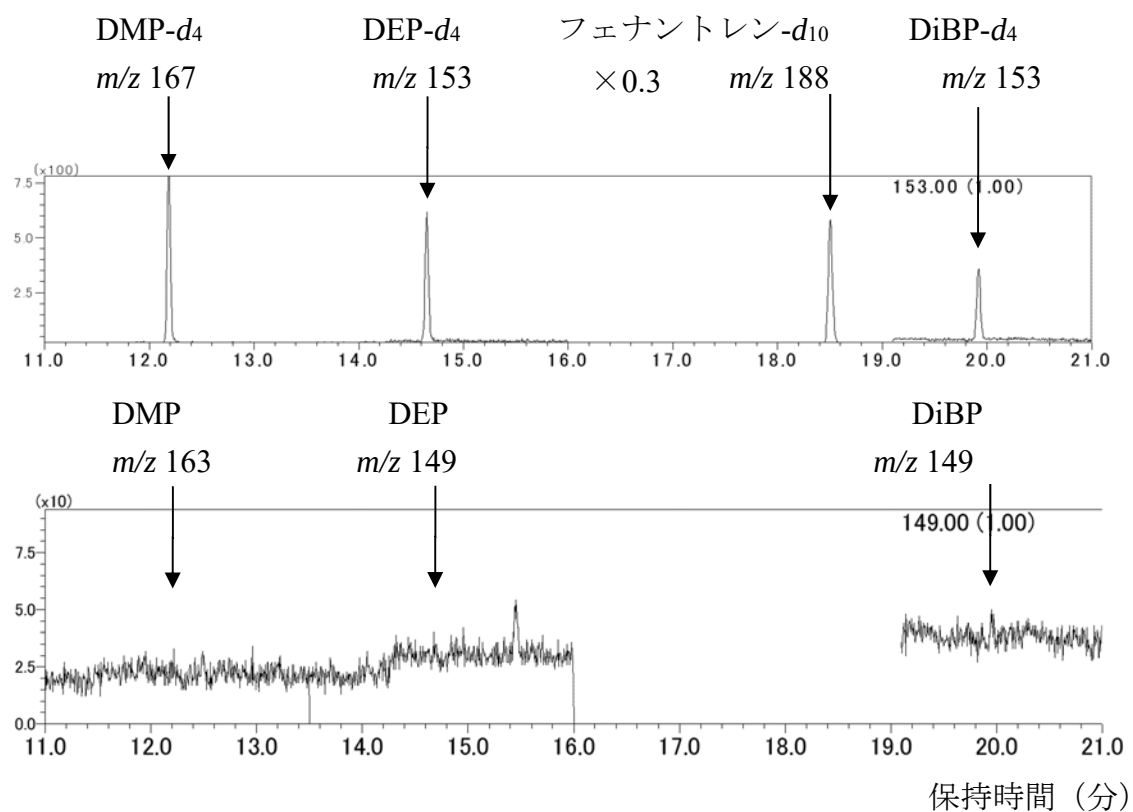


図 16 操作ブランク試験（Milli-Q 水）のクロマトグラム

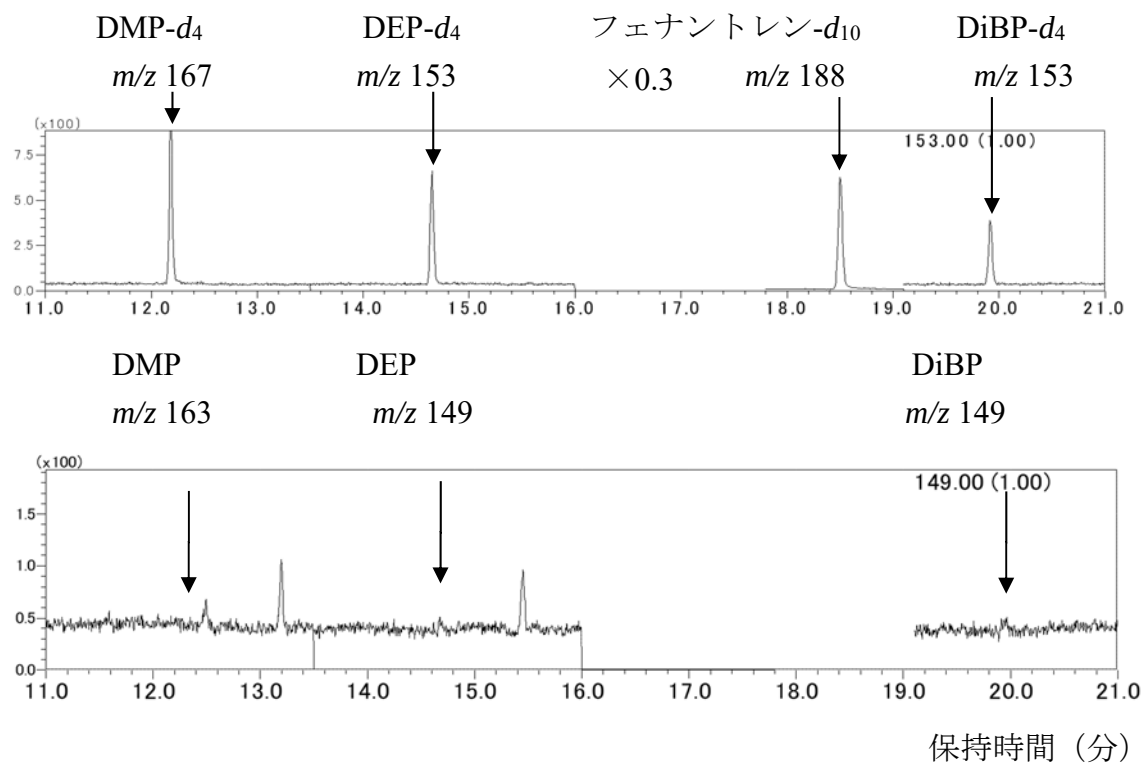


図 17 操作ブランク試験（ミネラルウォーター水）のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

横浜市内の海水（宝運河）への添加回収試験の結果を表 8 に示す。横浜市内の河川水（阿久和川）への添加回収試験の結果を表 9 に示す。海水、河川水ともに、回収率は 99%以上となり良好な結果であった。図 18 に海水（宝運河）のクロマトグラム、図 19 に海水にフタル酸エステルを添加した試料のクロマトグラムを示す。図 20 に河川水（阿久和川）のクロマトグラム、図 21 に河川水に標準物質を添加した試料のクロマトグラムを示す。

表 8 添加回収試験結果（海水）

対象物質	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率(%)
DMP	0.10	0	2	<0.011	-	-	100
	0.10	25	5	0.25	100	2.8	99
DEP	0.10	0	2	<0.013	-	-	113
	0.10	25	5	0.27	107	2.8	109
DiBP	0.10	0	2	<0.026	-	-	119
	0.10	25	5	0.24	97	4.1	119

表 9 添加回収試験（河川水）

対象物質	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率(%)
DMP	0.10	0	3	<0.011	-	-	103
	0.10	25	5	0.25	101	3.8	101
DEP	0.10	0	3	0.014	-	-	107
	0.10	25	5	0.27	102	2.7	104
DiBP	0.10	0	3	<0.026	-	-	111
	0.10	25	5	0.24	97	2.7	111

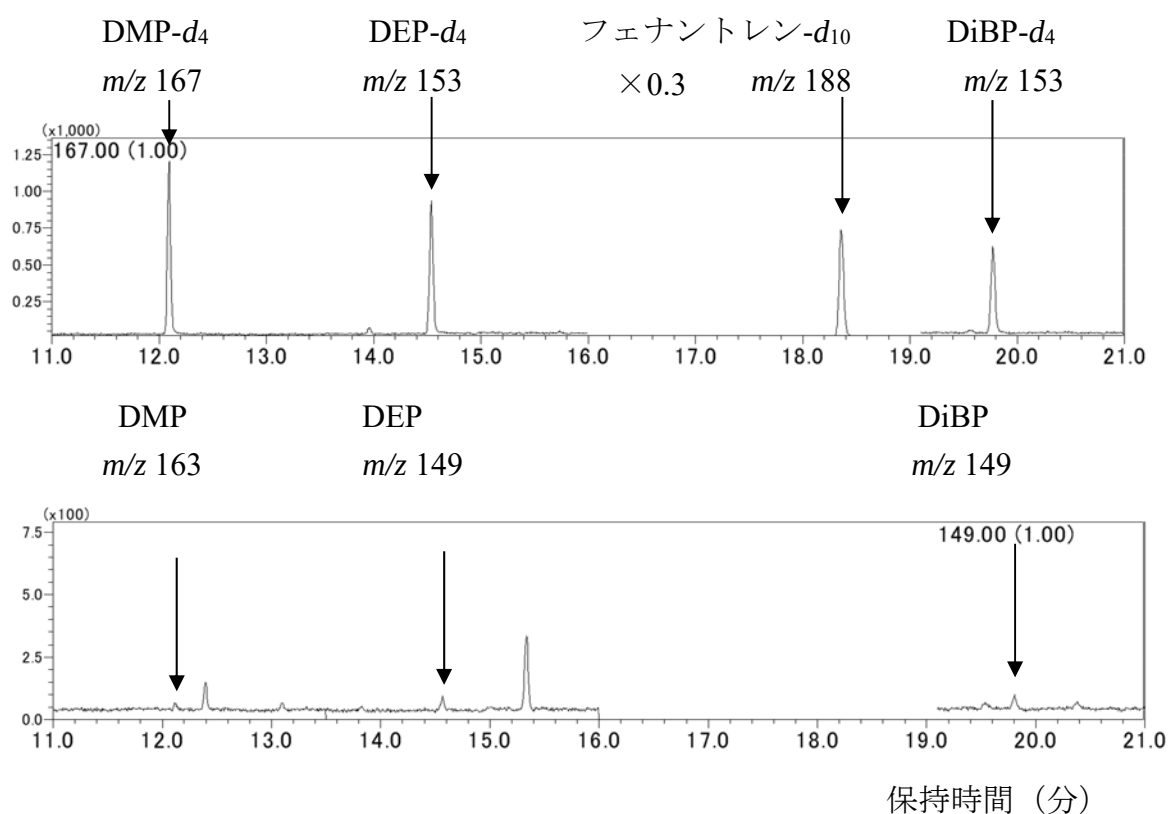


図 18 無添加試料（横浜市内の海水）のクロマトグラム

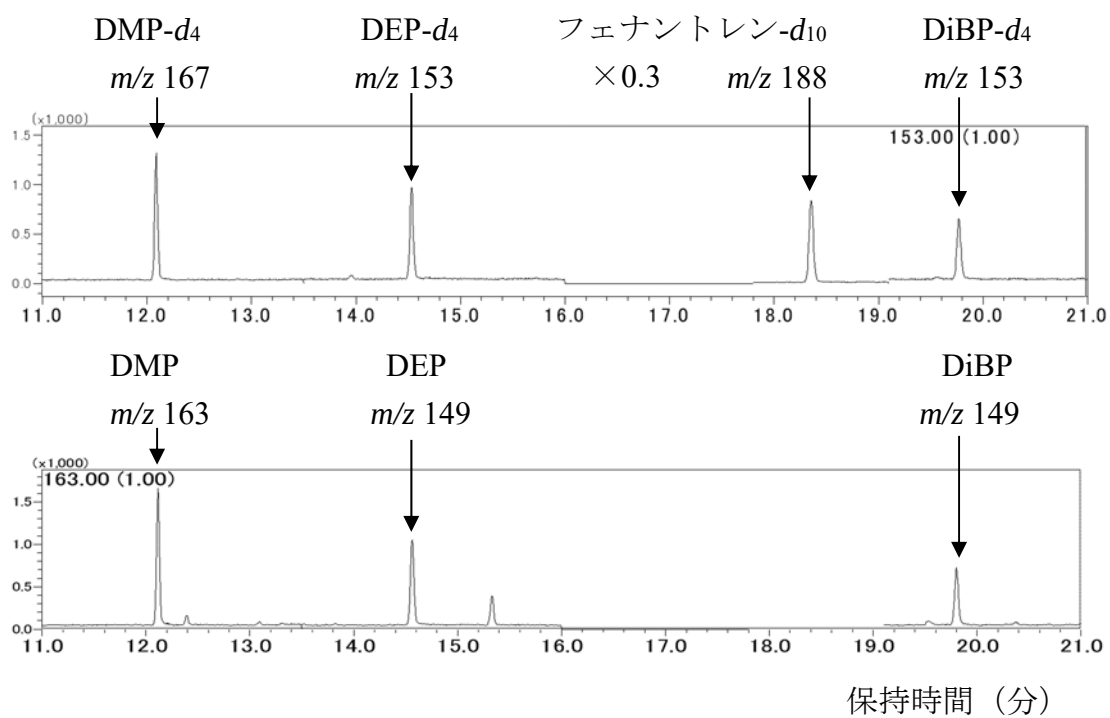


図 19 添加試料（横浜市内の海水）のクロマトグラム

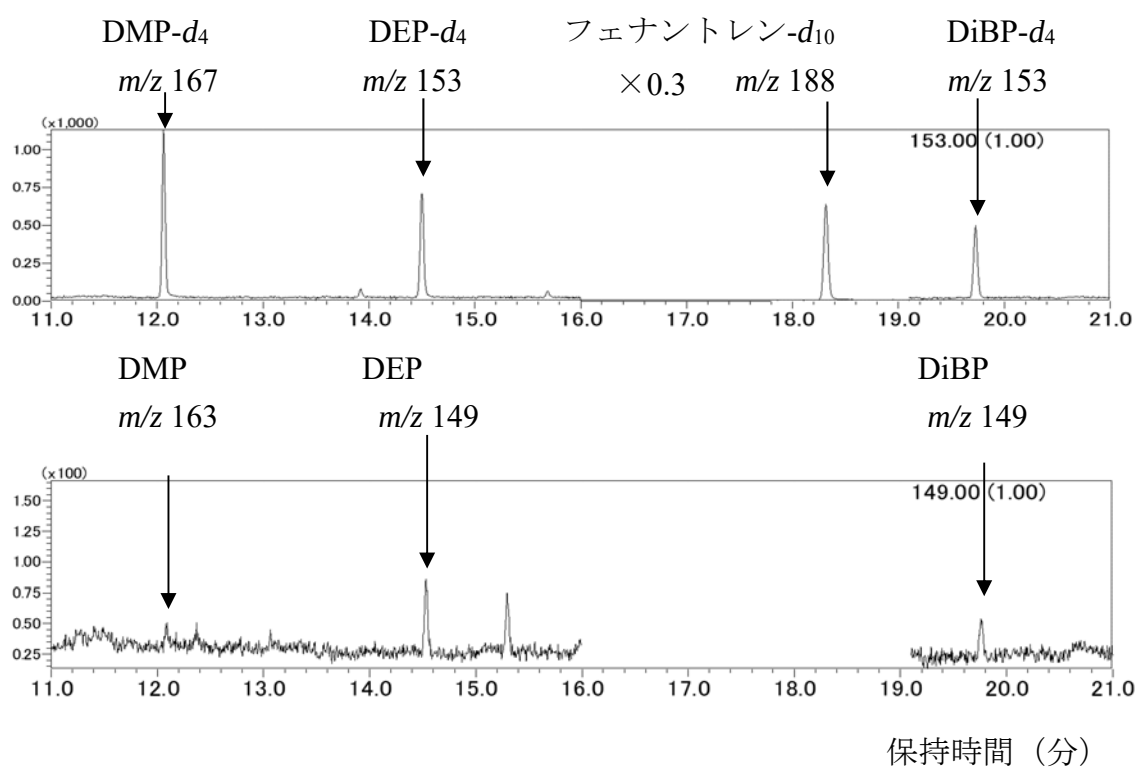


図 20 無添加試料（横浜市内の河川水）のクロマトグラム

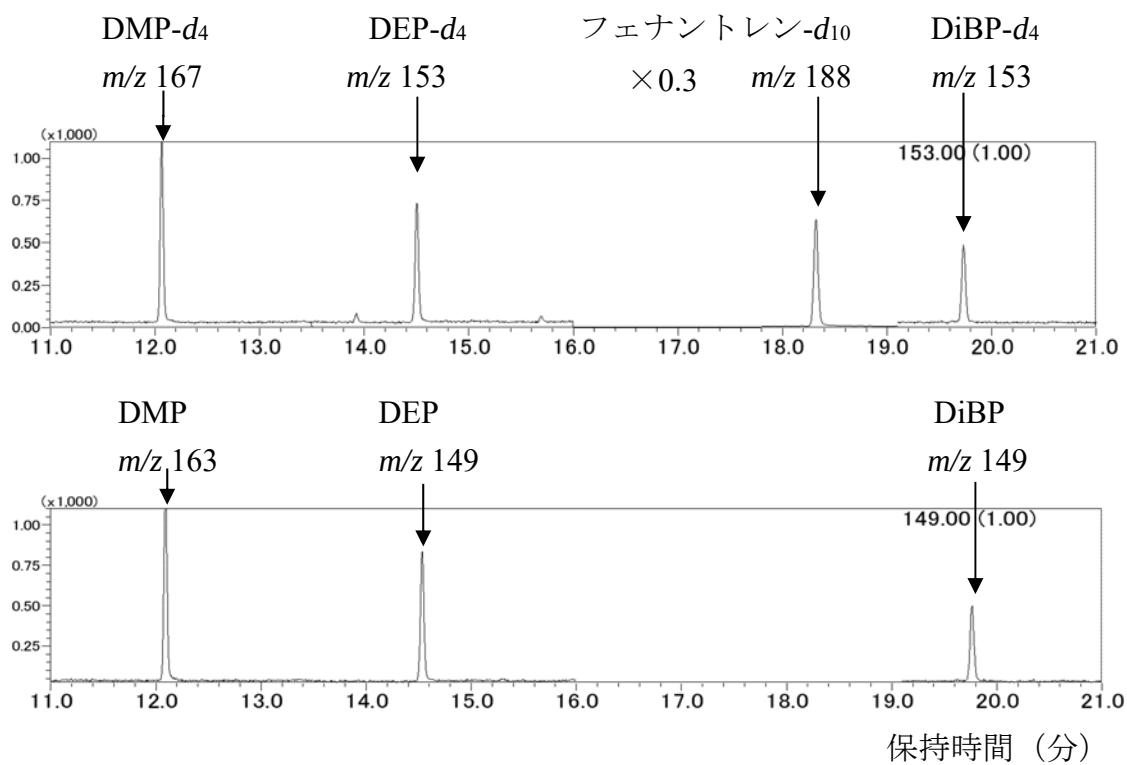


図 21 添加試料（横浜市内の河川水）のクロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 10 に示す。7 日後、いずれの pH においても 93%以上の残存率であった。

表 10 分解性スクリーニング試験結果

対象物質	pH	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
DMP	5	0.50	0.54 (107)	0.49 (98)	-
	7	0.50	0.53 (106)	0.47 (94)	0.47 (94)
	9	0.50	0.50 (100)	0.48 (95)	-
DEP	5	0.50	0.54 (108)	0.49 (98)	-
	7	0.50	0.54 (107)	0.47 (95)	0.47 (94)
	9	0.50	0.53 (105)	0.49 (99)	-
DiBP	5	0.50	0.54 (107)	0.47 (94)	-
	7	0.50	0.55 (110)	0.49 (97)	0.47 (95)
	9	0.50	0.54 (107)	0.46 (93)	-

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

横浜市内の海水（宝運河）の保存性試験の結果を表 11 に、その抽出液の結果を表 12 に示す。横浜市内の河川水（阿久和川）の保存性試験の結果を表 13 に、その抽出液の結果を表 14 に示す。また、冷凍庫(-20℃)にて保存した標準液の保存性試験の結果を表 15 に示す。いずれの結果も 95%以上の残存率となり、良好な結果となった。

表 11 保存性試験結果（海水）

対象物質	調製濃度 (μg/L)	7 日後の濃度 (μg/L)	残存率 (%)*
DMP	0.25	0.26	103
DEP	0.25	0.28	111
DiBP	0.25	0.25	99

*残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

** : 無添加試料は全て<MDL

表 12 保存性試験結果（抽出液）

対象物質	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	14 日後の濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率 (%)*
DMP	5.0	5.1	103
DEP	5.0	5.5	110
DiBP	5.0	4.9	99

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 13 保存性試験結果（河川水）

対象物質	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	7 日後の濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率 (%)*
DMP	0.25	0.25	99
DEP	0.27	0.27	100
DiBP	0.25	0.24	96

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

**：DMP 及び DiBP の無添加試料は<MDL、DEP の無添加試料は 0.014 $\mu\text{g/L}$

表 14 保存性試験結果（抽出液）

対象物質	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	14 日後の濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率 (%)*
DMP	5.0	5.0	100
DEP	5.3	5.4	101
DiBP	5.0	4.9	100

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 15 保存性試験結果（標準液）

対象物質	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	1 ヶ月後の濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率 (%)*
DMP	4.0	3.9	97
	25	24	98
DEP	4.0	4.2	105
	25	25	99
DiBP	4.0	4.0	100
	25	24	98

*残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔低濃度のフタル酸エステル類の確認について〕

DMP、DEP、DiBP のマススペクトルからも明らかなように、定量イオンの強度と比較して、確認イオンの強度が非常に小さいため、低濃度試料の場合、確認イオンによる確認は困難である。その場合は、GC/MS のカラムを変えて測定を行い確認する。今回の分析条件では、DB-5ms を DB-17ms に変更すると、フェナントレン-*d*₁₀ の保持時間が DiBP よりも遅くなった (図 22)。以下に DB-17ms を用いた測定条件を示す。

使用カラム	: DB-17ms 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm (Agilent 製)
カラム温度	: 80°C (1 min) → 10°C/min → 150°C (0 min) → 5°C/min → 210°C (0 min) → 10°C/min → 280°C (5 min)
注入口温度	: 250°C
試料導入方法	: スプリットレス (パージ 1 min)
試料注入量	: 1 μL
キャリアガス	: He 89.6 kPa (定圧)
インターフェース温度	: 250°C
イオン源温度	: 200°C

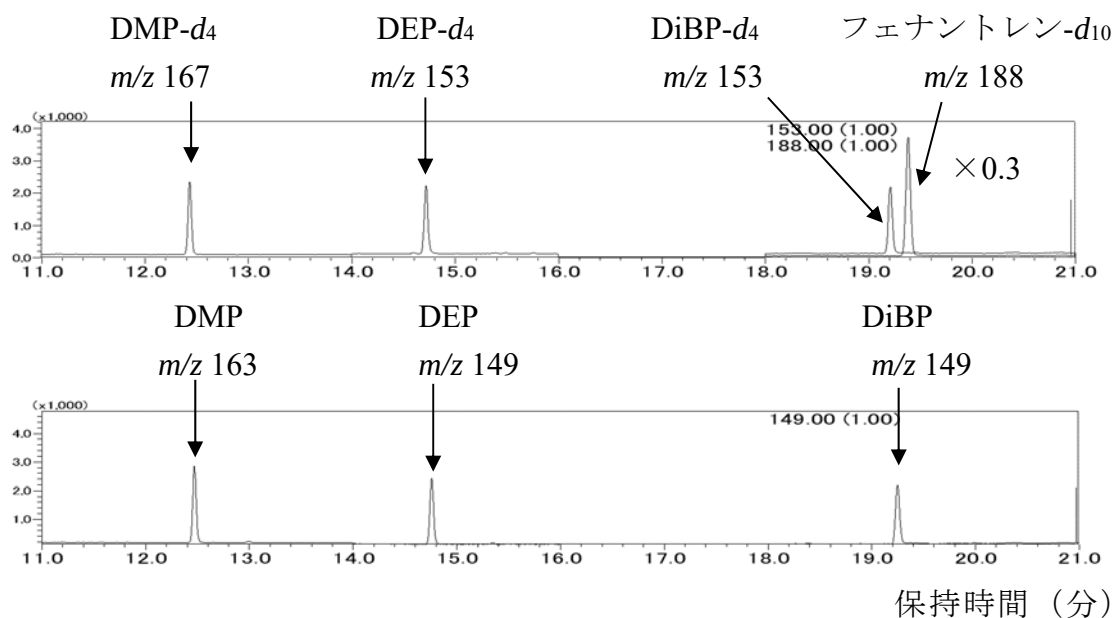


図 22 標準液(5.0 ng/mL)のクロマトグラム (DB-17ms 使用)

〔環境試料の分析例〕

横浜市内の海水（宝運河）及び河川水（阿久和川）の分析例を図 23、図 24 に示す（添加回収試験で用いたもの）。横浜市内の海水の場合は、DMP、DEP、DiBP、いずれも MDL 未満であり、河川水の場合は、DMP と DiBP は MDL 未満であったが、DEP は、MQL 未満であるが、MDL をわずかに超えていた(0.014 $\mu\text{g/L}$)。

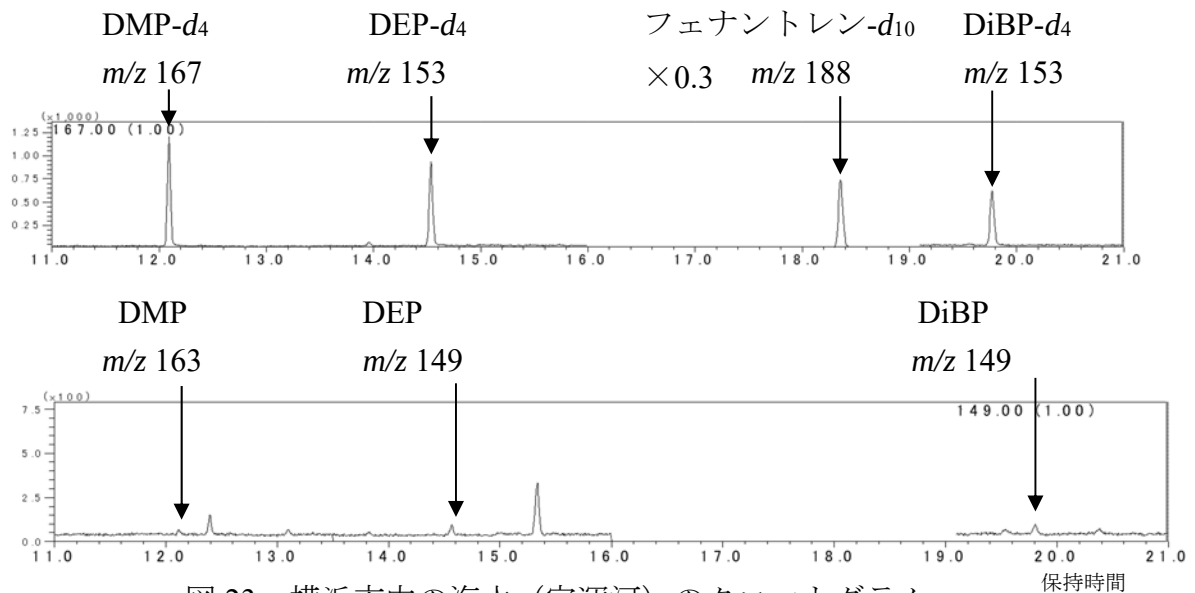


図 23 横浜市内の海水（宝運河）のクロマトグラム

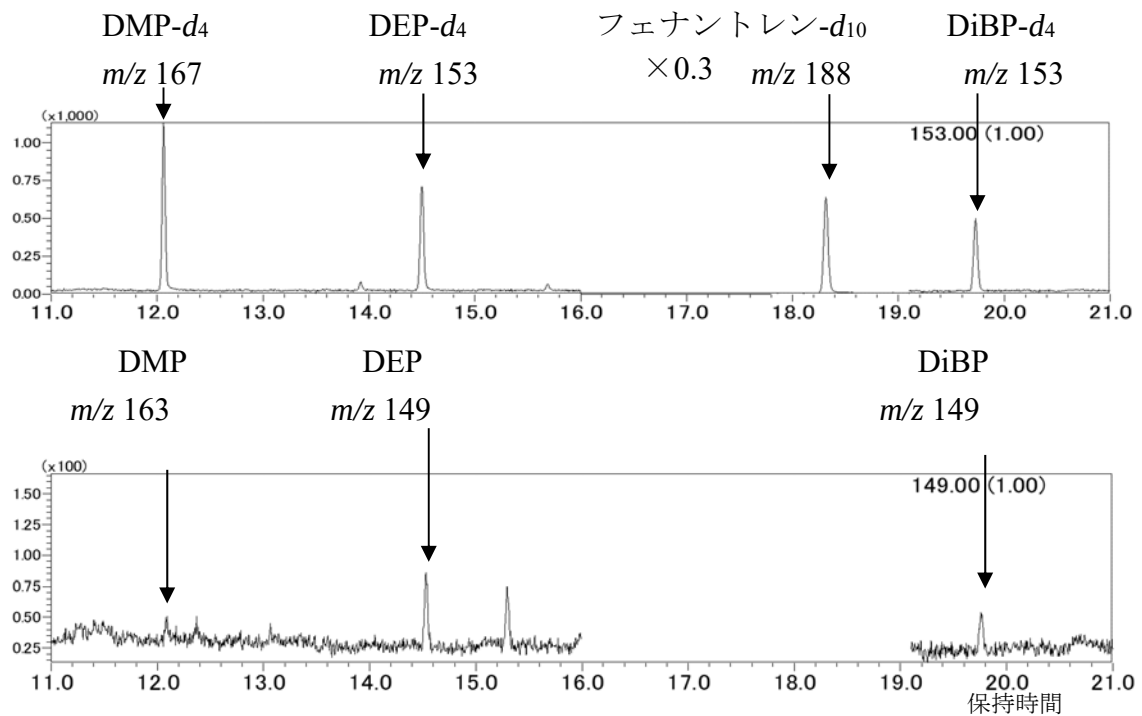


図 24 横浜市内の河川水（阿久和川）のクロマトグラム

【評価】

本法は、水質試料（海水、河川水）中の DMP、DEP、DiBP の分析に適用でき、検量線は 1.0～5.0 ng/mL 及び 5.0～25 ng/mL の濃度範囲でそれぞれ良好な直線性 ($r^2 > 0.995$) が確認された。MDL は DMP 0.011 µg/L、DEP 0.013 µg/L、DiBP 0.026 µg/L であった。精製水を用いたブランク試験は、3 物質とも MDL 未満であった。環境試料の横浜市内の海水（宝運河）及び河川水（阿久和川）を分析した結果、海水は、3 物質ともに MDL 未満であった。河川水は、DMP と DiBP が MDL 未満であったが、DEP が MDL をわずかに超えていた (0.014 µg/L、ただし MQL 未満)。海水及び河川水を用いた添加回収試験 (25 ng 添加) では、3 物質いずれも 97～107% という回収率であった。保存性試験は 7 日後において、海水、河川水の場合ともに 96% 以上であり、冷暗所中で測定対象の 3 物質は比較的安定と考えられた。

以上の結果から、本法を用いて水質試料中の 0.03 µg/L レベルの DMP、DEP、DiBP の測定が可能と判断される。

【参考文献】

- 1) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課、化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 27 年度版）、2016
- 2) Paluselli, A., Aminot, Y., Galgani, F., Net, S., Sempere, R., Occurrence of phthalate acid esters (PAEs) in the northwestern Mediterranean Sea and the Rhone River, Progress in Oceanography, 163, 221-231 (2018)
- 3) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課、平成 23 年度化学物質分析法開発調査報告書 フタル酸ノルマルブチルベンジル、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)、274-305 (2012)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 横浜市環境科学研究所

所属先住所 : 〒221-0024 横浜市神奈川区恵比須町 1 澁澤 ABC ビル 1 号館 5F

TEL 045-453-2550 FAX 045-453-2560

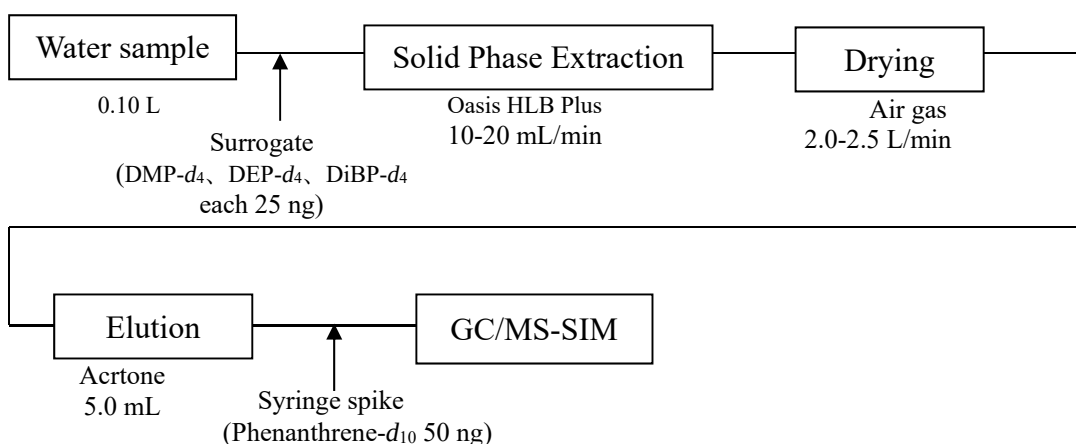
担当者名 : 酒井 学

E-mail : ma02-sakai@city.yokohama.jp

Dimethyl phthalate, Diethyl phthalate, Diisobutyl phthalate

An analytical method has been developed for the determination of dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP) and diisobutyl phthalate (DiBP) in water samples by gas chromatograph mass spectrometry (GC/MS). A water sample (100 mL) is added with a mixture of surrogates (DMP-*d*₄, DEP-*d*₄ and DiBP-*d*₄ : each surrogate compound is 25 ng). The sample solution is passed through a pre-conditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus). After dehydration of the cartridge, it is eluted with 5 mL of acetone. The eluate is adjusted to 5.0 mL by acetone and internal standard (phenanthrene-*d*₁₀ : 50 ng) is added to the eluate.

One milliliter of the eluate is poured into a glass vial and it is measured by GC/MS. The method detection limits (MDL) of DMP, DEP and DiBP are 0.011, 0.013 and 0.026 µg/L, respectively. The recovery rates of three phthalates from seawater and river water were both more than 90%. When this analysis method was applied to seawater and river water in Yokohama City, DMP and DiBP were not detected in seawater and river water. In the case of DEP, it was not detected in seawater, but it was more than MDL in river water.



物質名	分析法フローシート	備考
[1] フタル酸ジメチル 別名： ジメチルフタレート、DMP [2] フタル酸ジエチル 別名： ジエチルフタレート、DEP [3] フタル酸ジイソブチル 別名： ジイソブチルフタレート、DiBP	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 0.10 L サロゲート内標準添加 (DMP-d4、DEP-d4、 DiBP-d4 各 25 ng)] --> B[固相抽出 Oasis HLB Plus 10-20 mL/min] B --> C[乾燥 Air 通気 30 min 2.0~2.5 L/min] C --> D[溶出 アセトン 5.0 mL シリンジスパイク内標準添加 (フェナントレン-d10 50 ng)] D --> E[GC/MS-SIM] </pre>	分析原理： GC/MS-SIM 検出下限値： 【水質】 (µg/L) [1] 0.011 [2] 0.013 [3] 0.026 分析条件： 機器 GCMS： 島津製作所製 GCMS-QP2020 カラム Agilent 製 DB-5MS 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm

ベンゾフェノン-4

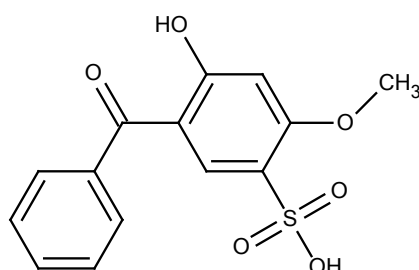
Benzophenone 4

IUPAC 名：5-Benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzenesulfonic acid

別名：2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン-5-スルホン酸、スリソベンゾン

2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid, Sulisobenzene

【対象物質の構造】



Benzophenone 4

CAS 番号：4065-45-6

分子式：C₁₄H₁₂O₆S

【物理化学的性状】

項目	値
分子量	308.304
モノアイソトピック質量	308.0355
融点 (°C)	118 – 123 ¹⁾
水溶解度 (g/L)	313.7 (25°C) ¹⁾
log P _{ow}	0.313 (22°C) ¹⁾

【毒性、用途等】

[実験動物に対する急性毒性情報]

急性毒性 ラット（経口）LD₅₀：3530 mg/kg、ウサギ（経皮）LD₅₀：> 5000 mg/kg ²⁾

[用途]

紫外線吸収剤

出典

1) Sigma-Aldrich MSDS

2) PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料を固相抽出カートリッジに通液し、メタノールで溶出後、LC/MS/MS-SRM (ESI-negative) で分析する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ベンゾフェノン4 : SIGMA-ALDRICH 製 analytical standard 純度 $\geq 97.5\%$
: 富士フィルム和光純薬製 LCMS 用
メタノール : 富士フィルム和光純薬製 超純水 LCMS 用
精製水 : 富士フィルム和光純薬製 高速液体クロマトグラフ用
ギ酸アンモニウム : Waters Oasis HLB
固相カートリッジ

【試薬の調製】

〔標準液〕

ベンゾフェノン4 20.0 mg を正確に量り取り、メタノールで 20 mL として 1000 $\mu\text{g/mL}$ のベンゾフェノン4 標準原液を調製する。この標準原液をメタノールで希釈し、1000 ng/mL の標準液を調製する。

〔検量線用標準液〕

1000 ng/mL 溶液をメタノール/精製水 (1:1) で順次希釈し、0.50～100 ng/mL の検量線用標準液を作成する。

【器具】

メスフラスコ、ホールピペット、駒込ピペット、メスシリンダー、ガラス製注射筒、固相抽出装置 (注 1)

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従う。試料はガラス容器に採取後、速やかに試験操作を行う。速やかに行えない場合は、冷暗所に保存する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

試料 100 mL を、あらかじめメタノール及び精製水の順に各 10 mL でコンディショニングした固相カートリッジに 10 mL/min で通液する。通液終了後の固相に精製水 10 mL を通して洗浄した後、注射器で空気を 10 mL 通気して固相中の水分を除去する。メタノール 6 mL を用いて 10 mL メスフラスコに溶出し、精製水を用いて 10 mL に定容し、試験液とする（注 1）。

【空試験液の調製】

試料水の代わりに精製水を用いて、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS 測定条件〕

〔LC〕

使用機種	: 島津製作所製 Nexera X2
カラム	: ジーエルサイエンス製 InertSustain C18 2.1×150 mm, 5 μm
移動相	: A: 10mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、B: メタノール 0 → 1 min A: 70 B: 30 1 → 9 min A: 70 → 5 B: 30 → 95 linear gradient 9 → 15 min A: 5 B: 95 15 min → 25 min A: 70 B: 30
流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C
注入量	: 2 μL (注 2)

〔MS〕

使用機種	: 島津製作所製 LCMS-8050
イオン化法	: ESI-Negative (注 2)
インターフェース電圧	: 3.0 kV
ヒーティングガス流量	: 10 L/min
ドライイングガス流量	: 10 L/min
ネブライザーガス流量	: 2 L/min

インターフェース温度	: 300°C
脱溶媒部 (DL) 温度	: 250°C
ヒートブロック温度	: 400°C
モニターイオン	: 定量イオン m/z 307.0 > 211.0 (35 V)
(コリジョン電圧)	確認イオン m/z 307.0 > 227.0 (23 V)
	(注2)

[検量線]

検量線用標準液 2 μ L を LC/MS/MS に注入し、対象物質の濃度と得られたピーク面積から検量線を作成する。

[定量]

試験液 2 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたピーク面積を検量線に照らして定量する。

[濃度の算出]

試料中の濃度 (ng/L) は次式により算出する。

$$\text{水質試料中の濃度 (ng/L)} = \text{検出濃度 (ng/mL)} \times \text{最終液量 (mL)} / \text{試料量 (L)}$$

[装置検出下限値 (IDL)]

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す (注3)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μ g/L)
ベンゾフェノン4	0.26	0.1	10	0.013

[分析方法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)]

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注4)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μ g/L)	MQL (μ g/L)
ベンゾフェノン4	0.10	10	0.019	0.049

注 解

- (注1) ガラス製体積計は、JIS R 3505 に記載のクラス A のものを使用する。
- (注2) 環境試料の状態によっては、マトリックス効果により感度が増大し、添加回収試験の回収率が 120%を超えることがある。その場合、試験液を希釈、注入量を減らす、ESI-ポジティブモード（モニターイオン m/z 309.0 > 231.0、 m/z 309.0 > 107.0）利用のいずれかによりマトリックス効果を抑制できるため、要求感度を考慮の上、これらの条件を変更して試験を行う。

(注3) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成28年3月)に従って表3のとおりに算出した。また、図1にIDL測定時のクロマトグラムを示す。

表3 IDLの算出結果(詳細)

物質名	ベンゾフェノン4
試料量 (L)	0.10
最終液量 (mL)	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.50
注入量 (pg)	1.0
注入量 (μL)	2.0
結果 1 (pg)	0.962
結果 2 (pg)	0.911
結果 3 (pg)	1.00
結果 4 (pg)	0.855
結果 5 (pg)	1.05
結果 6 (pg)	0.930
結果 7 (pg)	0.884
平均値 (pg)	0.9422
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.0678
IDL (pg)*	0.26
IDL 試料換算値 (ng/L)	13
S/N	14
CV (%)	7.2

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

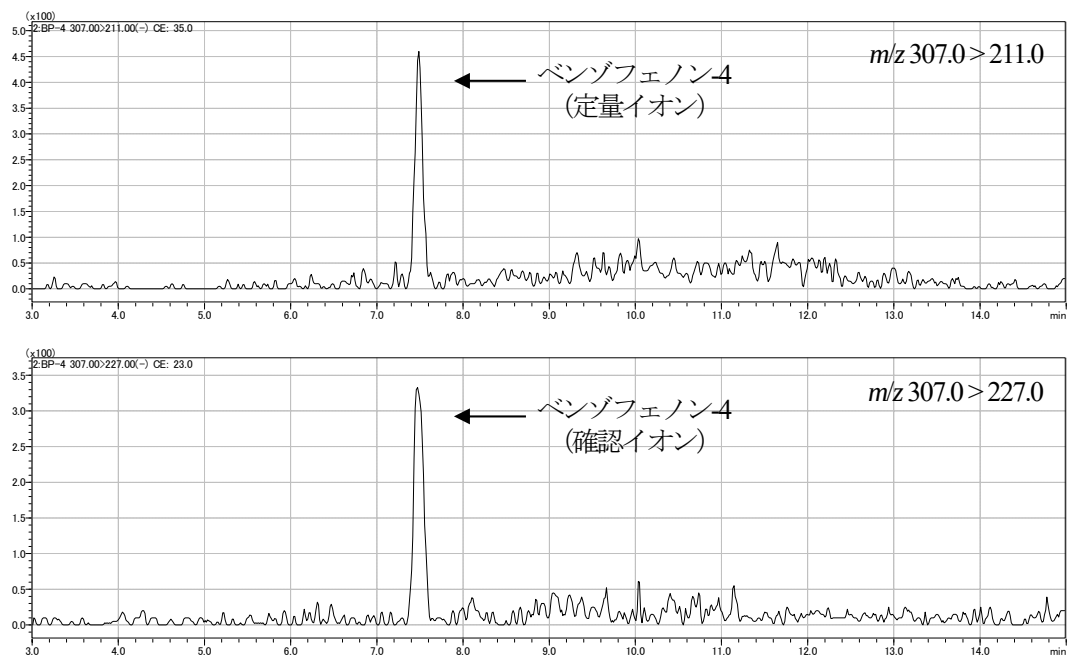


図1 IDL 測定時 (0.50 ng/mL) のクロマトグラム

(注4) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って表 4 のとおりに算出した。また、図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

物質名	ベンゾフェノン4	回収率
試料	河川水	-
試料量 (L)	0.10	-
標準添加量 (μg)	0.010	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.10	-
最終液量 (mL)	10	-
注入液濃度 (ng/mL)	1.0	-
装置注入液量 (μL)	2.0	-
操作ブランク平均 (μg/L) ^{*1}	<0.019	-
無添加平均 (μg/L) ^{*2}	<0.019	-
結果 1 (μg/L)	0.114	114
結果 2 (μg/L)	0.108	108
結果 3 (μg/L)	0.104	104
結果 4 (μg/L)	0.0984	98.4
結果 5 (μg/L)	0.103	103
結果 6 (μg/L)	0.106	106
結果 7 (μg/L)	0.102	102
平均値 (μg/L)	0.1050	105.1
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.0491	
MDL (μg/L) ^{*3}	0.019	
MQL (μg/L) ^{*4}	0.049	
S/N 比	32	
CV (%)	4.7	

*1: 空白試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*2: MDL 算出用試料に標準を添加して得た状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

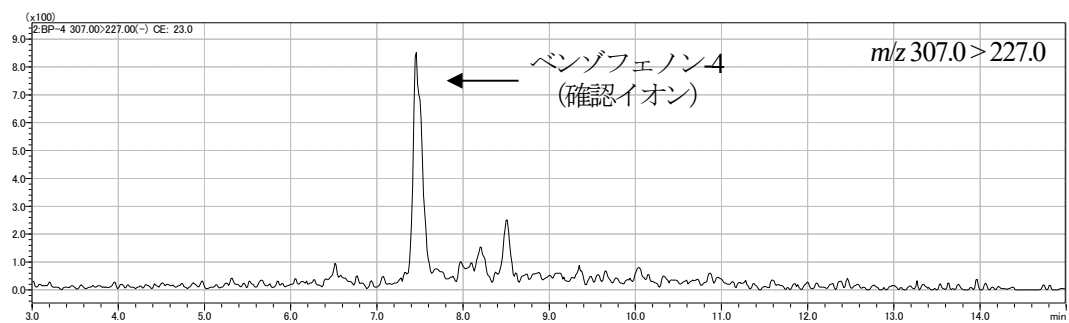
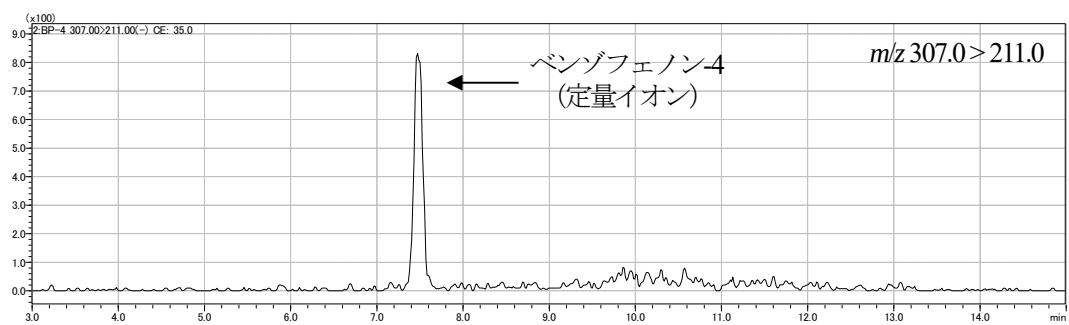


図2 MDL 測定時のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

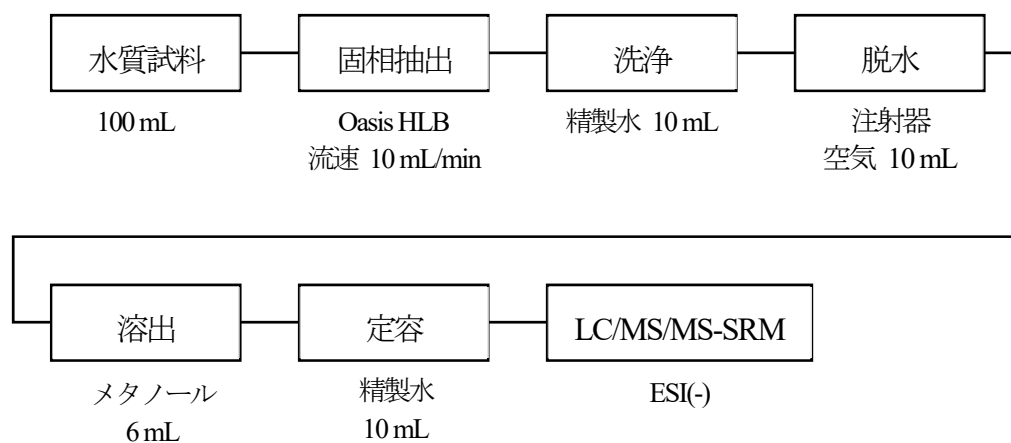


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線作成用データを表5に、検量線を図4-1及び4-2に示す。検量線用標準液のクロマトグラムを図5に示す。

表5 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	応答値 (m/z 307.0 > 211.0)
0.50	2972
1.0	5990
2.0	11525
5.0	27850
10	57123
20	114514
50	300357
100	656298

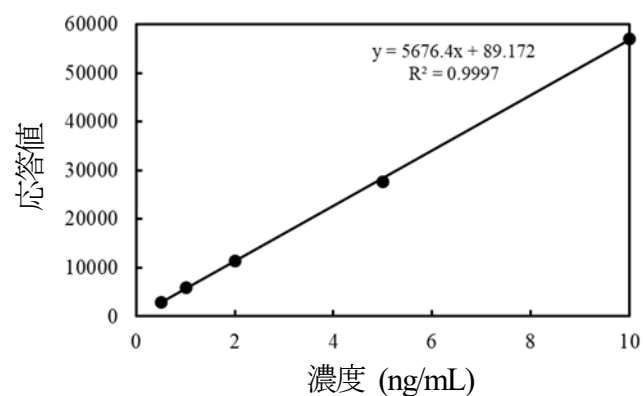


図 4-1 低濃度域検量線 (0.50~10 ng/mL)

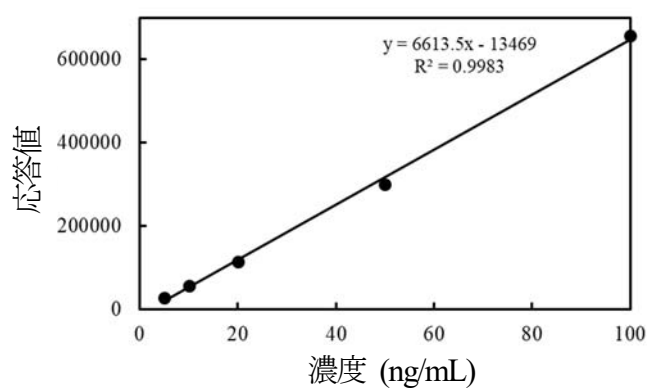


図 4-2 高濃度域検量線 (5.0~100 ng/mL)

[クロマトグラム]

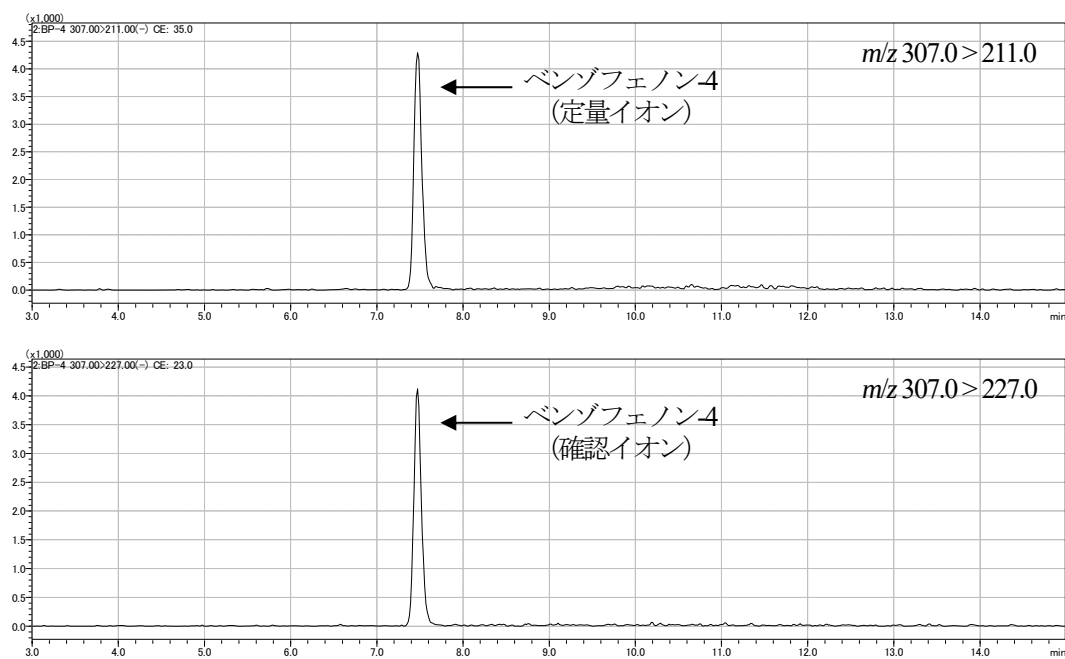


図 5 検量線用標準液のクロマトグラム(5.0 ng/mL)

[マススペクトル]

ベンゾフェノン4のマススペクトル及びプレカーサーイオン m/z 307.0 に対するプロダクトイオンをそれぞれ図 6-1、図 6-2 に示す。

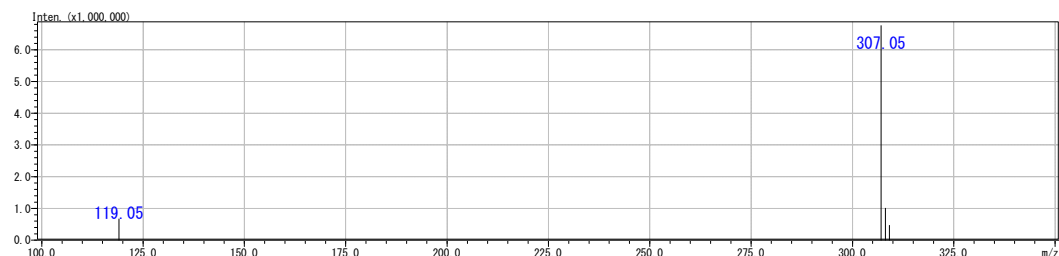


図 6-1 ベンゾフェノン4のマススペクトル

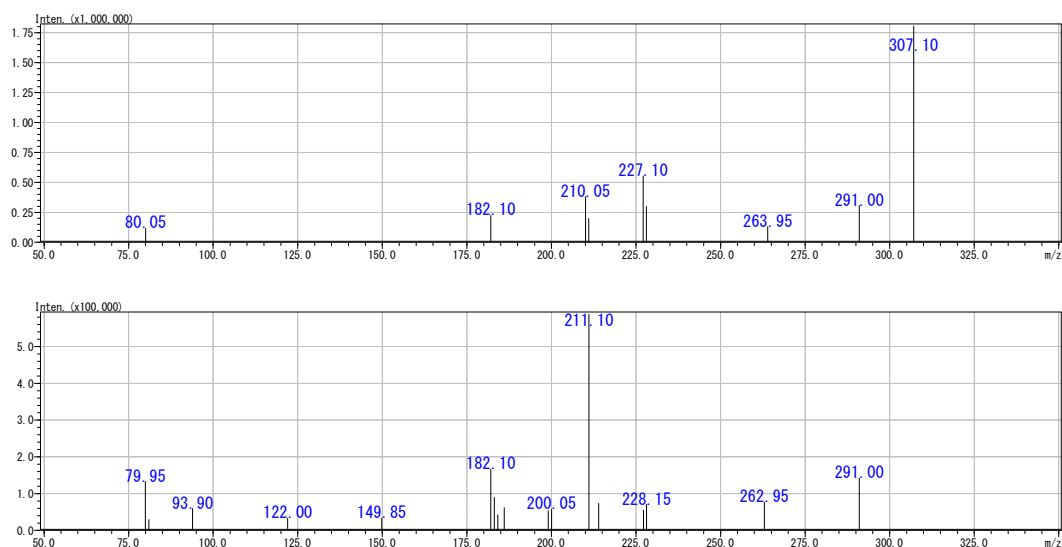


図 6-2 ベンゾフェノン4のプレカーサーイオン m/z 307.0 に対するプロダクトイオンスペクトル (上段: コリジョン 23 V、下段: コリジョン 35 V)

[操作ブランク試験]

操作ブランク試験結果を表 6 に、クロマトグラムを図 7 に示す。ピークは検出されなかった。

表 6 操作ブランク試験結果

物質名	試験数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)
ベンゾフェノン4	2	<0.019

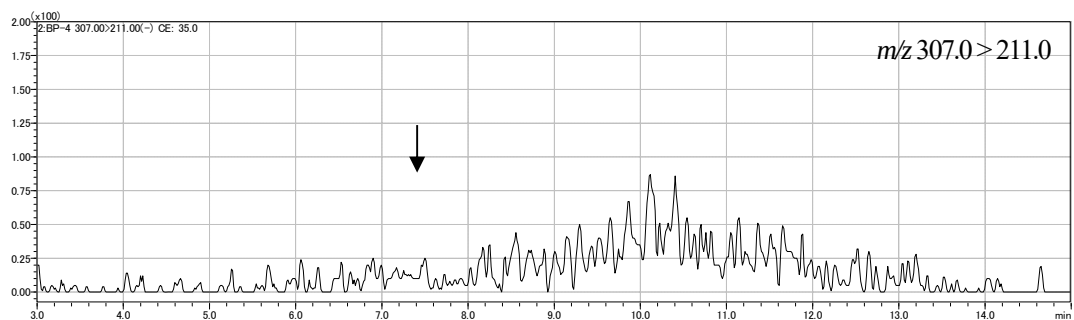


図7 操作ブランク試験のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（雷山川）、海水（大牟田沖）への標準物質添加回収試験結果を表7に、クロマトグラムを図8-1 及び8-2 に示す。

表7 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ベンゾフ エノン-4	河川水	0.100	0	10	2	<0.019	-	-
		0.100	0.0100	10	7	0.105	105	4.7
	海水	0.100	0	10	2	<0.019	-	-
		0.100	0.0500	10	5	0.504	101	2.5

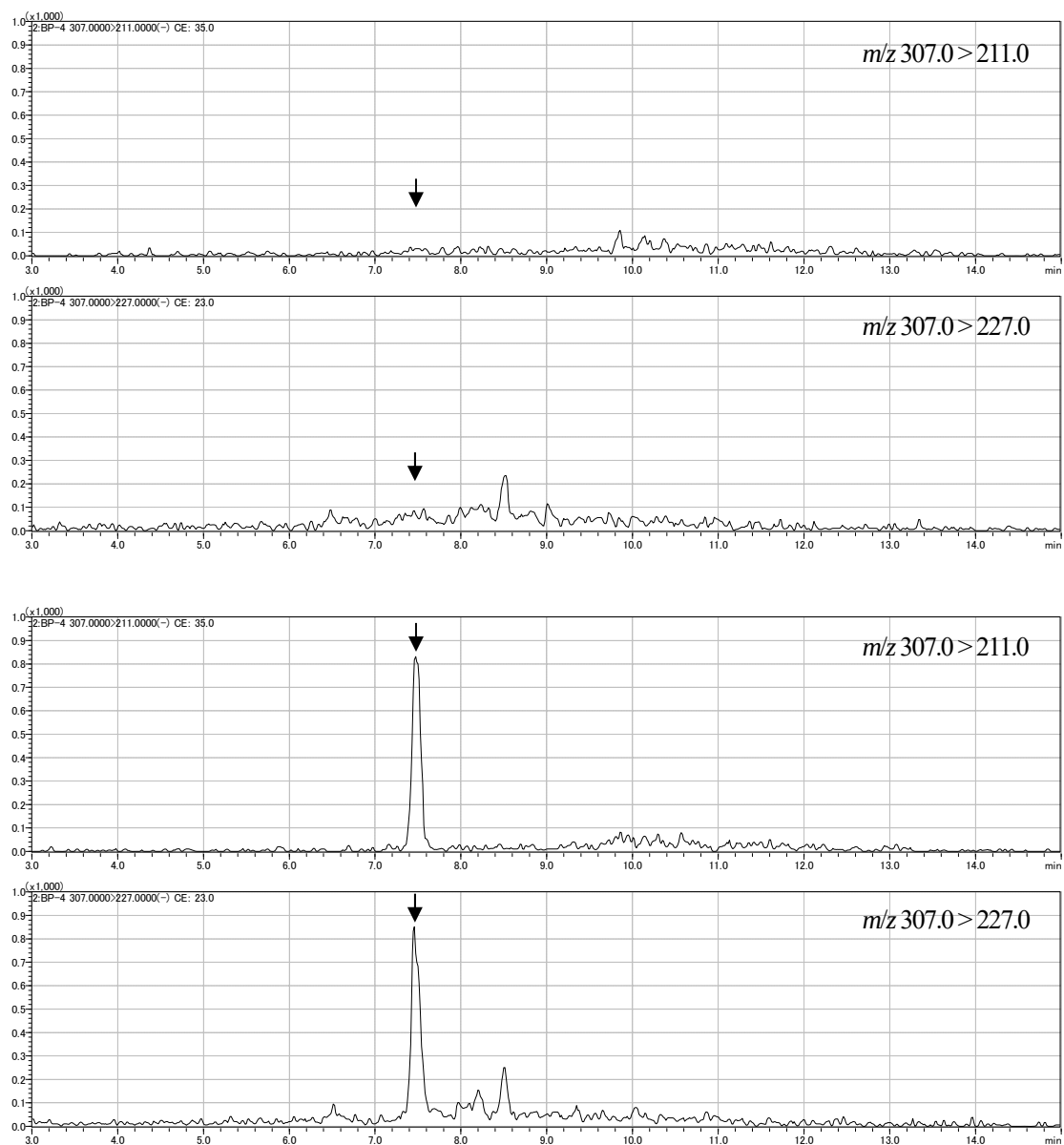


図8-1 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム
（上図：無添加試料、下図：添加試料）

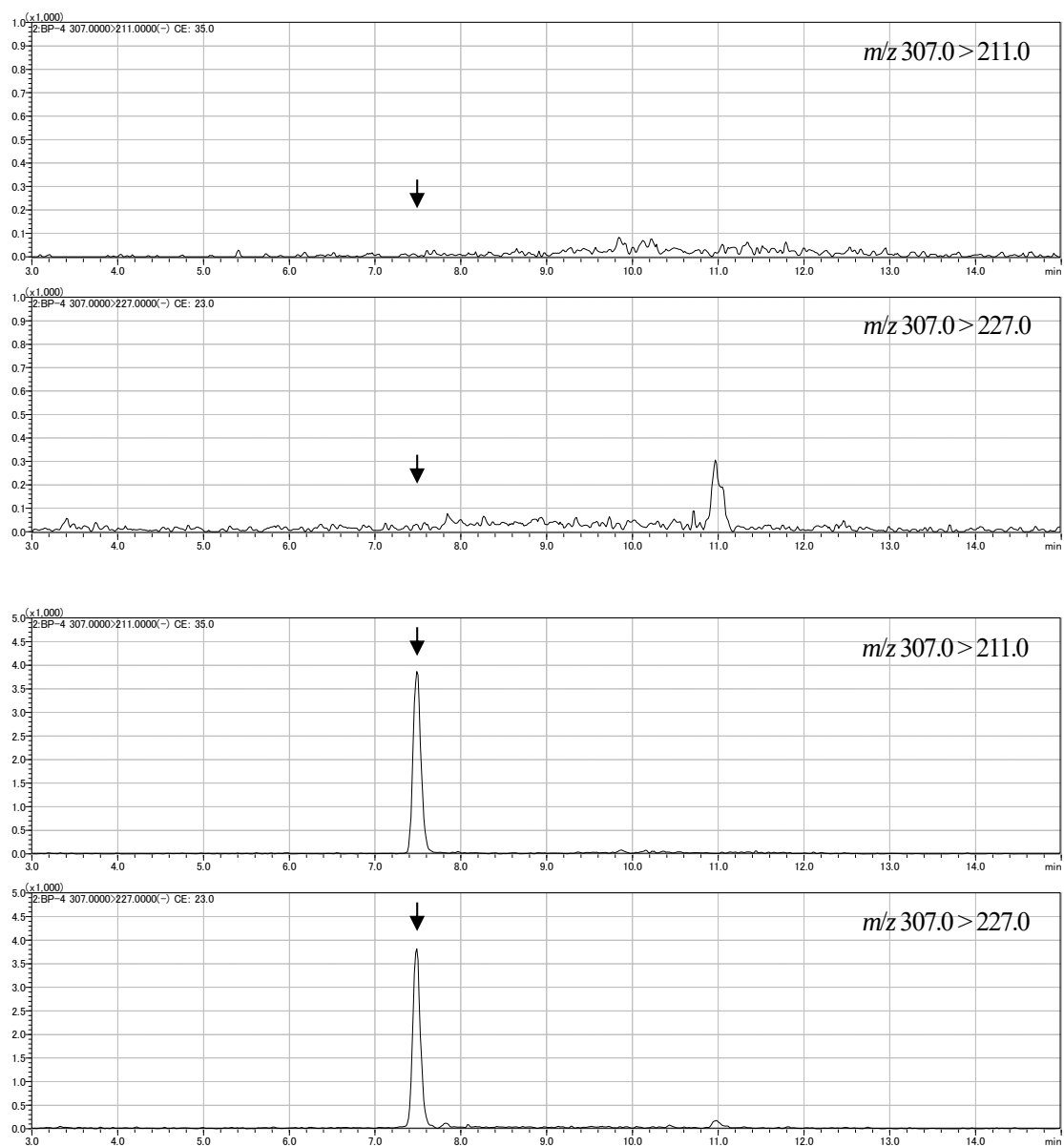


図 8-2 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（上図：無添加試料、下図：添加試料）

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 8 に示す。いずれの条件においても、分解は認められなかった。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度 (ng/mL) (残存率(%)*)		
			1 時間放置後	7 日間放置後	
				暗所	明所
5	2	2.5	2.4 (96)	2.4 (96)	-
7	2	2.5	2.4 (97)	2.5 (98)	2.5 (100)
9	2	2.5	2.4 (97)	2.3 (93)	-

* 残存率(%) : 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 9 に示す。環境試料の保存性試験は、水質試料 0.10 L に 20 ng のベンゾフェノン-4 を添加し、冷蔵保存した後、7 日後に測定した。

表 9 保存性試験結果

試料名		試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
				7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	2	0.20	0.197 (99)	-	-
	粗抽出液	2	2.0	-	2.07 (104)	-
海水	試料	2	0.20	0.197 (99)	-	-
	粗抽出液	2	2.0	-	2.01 (101)	-
標準液	MDL の 10 倍程度	2	2.0	-	-	1.96 (98)
	検量線最高濃度	2	100	-	-	101 (101)

* 残存率(%) : 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔固相カートリッジの検討〕

4 種類の固相 (Oasis HLB、Sep-Pak PS2、Sep-Pak C18、Sep-Pak tC18) を用いて、添加回収試験を行った。精製水 100 mL にベンゾフェノン-4 を 20 ng 添加して試料水とした。各固相をメタノール 5 mL、精製水 5 mL でコンディショニングした後、試料水を通液した。通液後、各固相を精製水 10 mL で洗浄し、メタノール 6 mL で溶出した後、精製水で 10 mL に定容して測定した。装置への試料注入量は 5 μ L とした。

結果を表 10 に示す。Oasis HLB 及び Sep-Pak PS2 を用いた場合の回収率はほぼ 100%で

あった。

表 10 固相カートリッジの検討結果（試料：精製水）（単位：％）

Oasis HLB	Sep-Pak PS2	Sep-Pak C18	Sep-Pak tC18
104	100	81	81

上記の検討において回収率が良好であった Oasis HLB 及び Sep-Pak PS2 を用い、河川水及び海水の添加回収試験を行った。試料として福岡県の雷山川及び大牟田沖で採取した水を用いて試験を行った。各試料 100 mL にベンゾフェノン-4 を 20 ng 添加して試料水とした。各固相をメタノール 5 mL、精製水 5 mL でコンディショニングした後、試料水を通液した。通液後、各固相を水 10 mL で洗浄し、メタノール 6 mL で溶出した後、水で 10 mL に定容して測定した。装置への試料注入量は 5 µL とした。結果を表 11 に示す。河川水でいずれの固相とも回収率が 120%を超えた。

表 11 河川水及び海水における回収率（単位：％）

試料	Oasis HLB	Sep-Pak PS-2
河川水	128	121
海水	106	106

〔クリーンアップの検討〕

河川水の回収率が 120%を超えたことから、固相抽出におけるクリーンアップの検討を行った。

Oasis HLB で環境試料を抽出後、精製水 10 mL により洗浄を行うが、さらに 10%メタノール 10 mL での洗浄を追加した場合の効果を検証した。結果を表 12 に示す。10%メタノール洗浄を加えることで、河川水は回収率がほぼ 100%となったが、海水の回収率が低下した。

表 12 固相の洗浄による回収率の検討（単位：％）

試料	固相の洗浄水	
	精製水 10 mL	精製水 10 mL +10%メタノール 10 mL
河川水	128	100
海水	106	77

クリーンアップの追加として、陰イオン交換カートリッジである Oasis WAX による精製を検討した。100 mL の精製水及び河川水にそれぞれベンゾフェノン-4 を 40 ng 添加し、HLB で固相抽出を行い、10%メタノール洗浄等を行った後、HLB の下方にあらかじめメタノールでコンディショニングを行った WAX を接続し、メタノール 10 mL を通液した。HLB を取り外し、WAX にアンモニア/メタノール (5:95) 10 mL を通液して溶出した。精製水で 20 mL に定容して試験液とした。結果を表 13 に示す。精製水、河川水とも回収率が低下した。

表 13 Oasis WAX による精製水及び河川水の精製検討結果

試料	回収率 (%)
精製水	76
河川水	83

〔マトリックス効果の検証及び低減の検討〕

河川水の回収率が 120%を超えたことについては、LC/MS 測定におけるマトリックスによる影響と考えられたため、これを検証するための試験を行った。「精製水」、「河川水抽出液」、「河川水抽出液をメタノール/精製水 (1:1) で 10 倍に希釈した液」及び「同じく 100 倍に希釈した液」各 1 mL にベンゾフェノン-4 を 2 ng 添加して測定を行った。装置への試料注入量は 5 μ L とした。精製水に添加した液に対する、河川水抽出液試料の濃度の比較を表 14 に示す。希釈することにより回収率が 100%に近づいたことから、回収率が高い原因はマトリックス効果による感度の増大であることが確認された。

表 14 河川水抽出液の希釈倍率の検討結果

試料	濃度比* (%)
河川水抽出液 (希釈なし)	123
河川水抽出液 (10 倍希釈)	109
河川水抽出液 (100 倍希釈)	102

*：精製水の濃度に対する検出濃度割合

次に、マトリックス効果の低減のため、装置への試料注入量をこれまでの 5 μ L から 2 μ L にした場合の確認を行った。結果を表 15 に示す。注入量を 2 μ L にすることで、河川水の回収率が 120%を下回った。

表 15 試料注入量による回収率の検討 (単位 : %)

試料	注入量	
	5 μ L	2 μ L
河川水	128	105
海水	106	101

〔試料の直接注入の検討〕

固相カラムによる濃縮・精製を行わず、試料を直接 LC/MS に注入して測定する検討を行った。試料として、精製水、河川水及び海水を用いた。各試料 1 mL にベンゾフェノン-4 を 2 ng 添加した。これをフィルターバイアル (Thomson 製、0.45 μ m PTFE フィルター付バイアル) に入れてろ過し、測定した。試料注入量は 2 μ L とし、LC のバルブシステムを利用して試料中の塩が MS に導入されないよう設定した。結果を表 16 に示す。回収率は、河川水は良好であったが、海水では悪かった。

表 16 試料直接注入法での回収率検討結果

試料	濃度比* (%)
河川水	100
海水	68

* : 精製水の濃度に対する検出濃度割合

〔分析カラムの検討〕

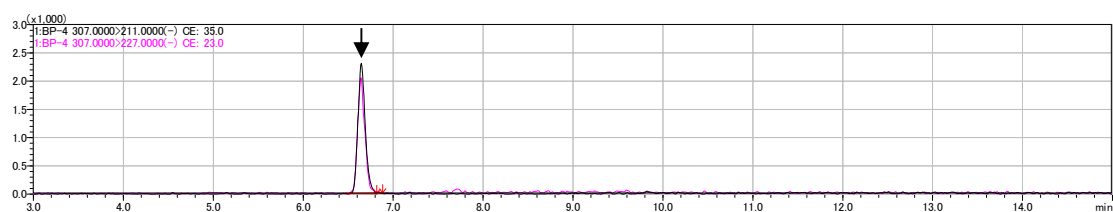
LC/MS/MS 分析におけるカラムについての検討を行った。検討に用いたカラムは下記のとおりである。

- ① XBridge C18 (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)
- ② InertSustain C18 (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)
- ③ InertSustain AQ-C18 (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)
- ④ Scherzo SS-C18 (3 μ m, 2.0 $\times$ 150 mm)
- ⑤ InertSustain PFP (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)
- ⑥ XSelect CSH Phenyl-Hexyl (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)
- ⑦ InertSustain Phenyl (5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm)

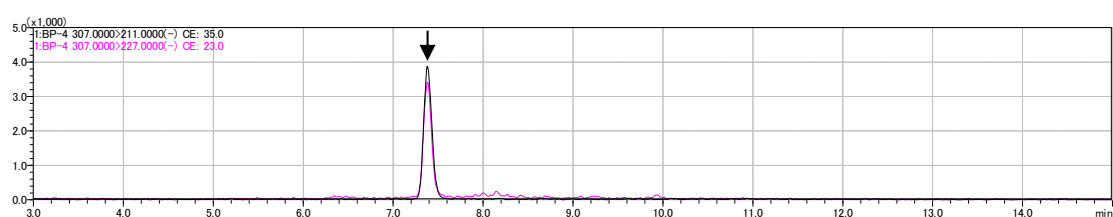
上記のカラムを用いて標準液を測定した結果、④及び⑤のカラムではベンゾフェノン-4 のピークが確認されなかった。ピークが確認された①、②、③、⑥、⑦のクロマトグラムを図 9 に示す。⑦のカラムは、ベースラインの変動が見られた。

ピーク形状が良好であった①、②、③及び⑥のカラムを用いて、河川水抽出液 1 mL にベンゾフェノン-4 を 2 ng 添加して測定を行い、2 ng/mL の標準液の面積値との比較を行

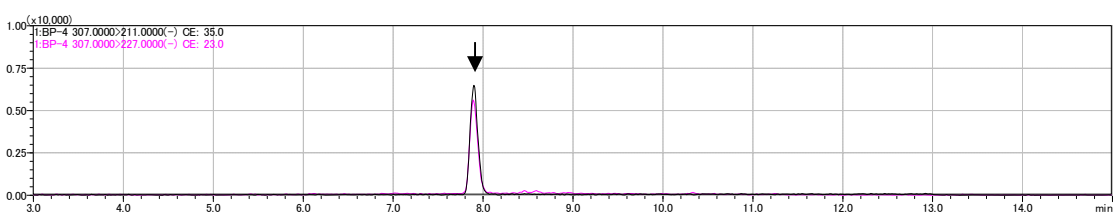
った。装置への試料注入量は5 μ Lとした。結果を表17に示す。ピークが検出された4種類のカラムはいずれも回収率が約120%であり、カラムによる回収率の違いは見られなかった。



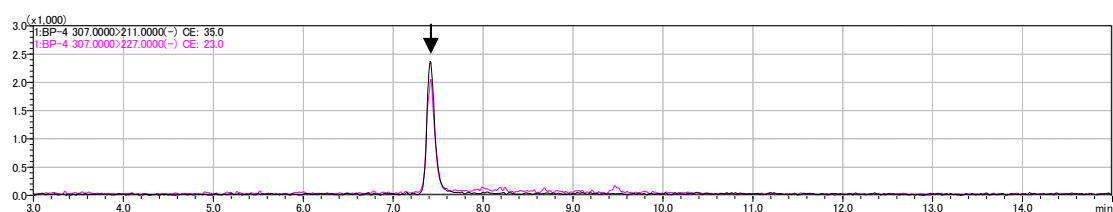
① XBridge C18



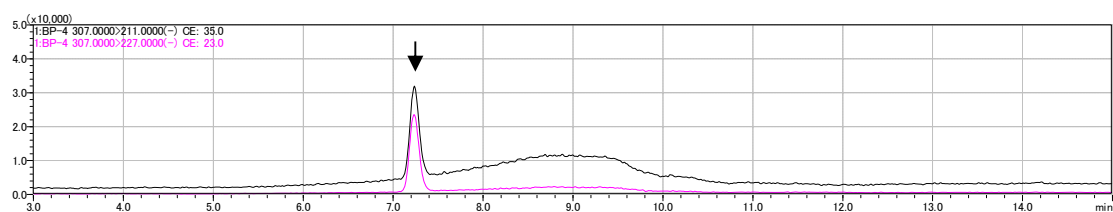
② InertSustain C18



③ InertSustain AQ-C18



⑥ XSelect CSH Phenyl-Hexyl



⑦ InertSustain Phenyl

図9 分析カラム検討時のクロマトグラム

表 17 分析カラムの検討結果

カラム	保持時間 (分)	面積比* (%)
① XBridge C18	6.8	128
② InertSustain C18	7.4	124
③ InertSustain AQ-C18	7.9	123
⑥ XSelect CSH Phenyl-Hexyl	7.4	114

* : 2 ng/mL の標準液の面積値を 100 とした場合の面積比

〔MS 測定条件（イオン化モード）の検討〕

これまでの検討では、MS のイオン化モードは ESI ネガティブモードを用いていたが、ESI ポジティブモードについても検討を行った。ネガティブモード及びポジティブモードにおける、標準液 (2 ng/mL) 及び環境試料 (MDL 算出時と同じ条件 (表 4) で作成したもの) のクロマトグラムをそれぞれ図 10-1 及び 10-2 に示す。環境試料の定量イオンの S/N は、ネガティブモードが 32、ポジティブモードが 9.5 であり (n=7)、ポジティブモードは S/N が低く、確認イオンの感度が悪かった。

また、マトリックスの影響を確認するため、標準液 (2 ng/mL) と環境水抽出液 (河川水抽出液 1 mL にベンゾフェノン-4 を 2 ng 添加したもの) の面積値の違いを確認した。検討結果を表 18 に示す。回収率はポジティブモードのほうが若干良好であった。

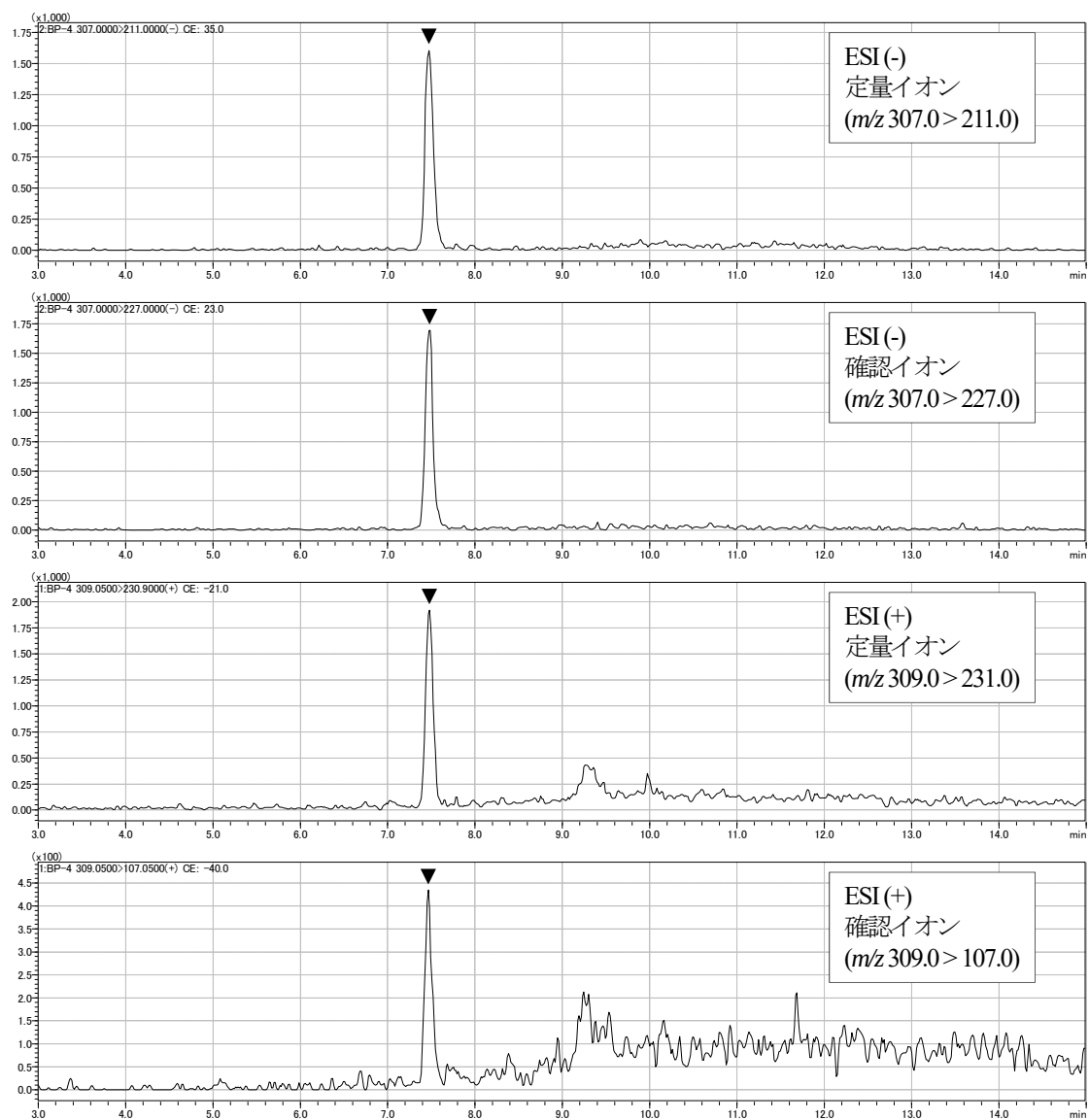


図 10-1 ベンゾフェノン4 標準液 (2 ng/mL) のクロマトグラム

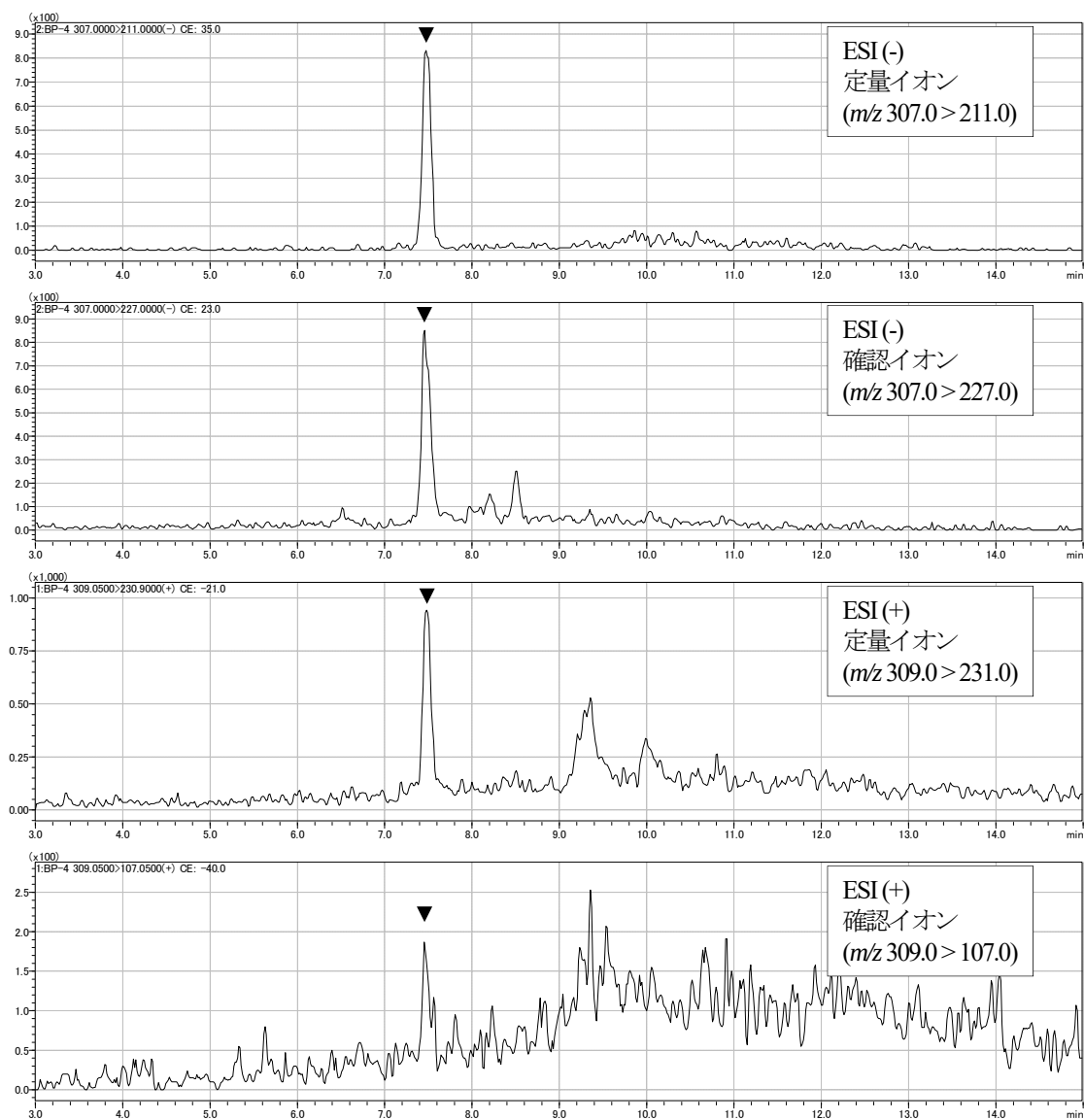


図 10-2 環境試料のクロマトグラム

表 18 イオン化モードの検討結果

モード	面積比* (%)
ESI ネガティブモード	126
ESI ポジティブモード	108

* : 2 ng/mL の標準液の面積値を 100 とした場合の面積比

【環境試料の分析】

本法を用いて福岡県内の河川水（雷山川）及び海水（大牟田沖）を測定した結果、ベンゾフェノ-4 はいずれも検出されなかった（図 8-1 及び図 8-2）。

【評価】

環境水中に含まれるベンゾフェノン-4 の分析法を開発した。本分析法で用いた LC/MS/MS による分析対象物質の IDL は、0.26 pg (IDL 試料換算値 13 ng/L) であり、0.50 ～100 ng/mL の範囲で直線性 ($r^2 > 0.998$) が確認された。固相抽出法による前処理を行う本分析法の MDL 及び MQL は、0.019 µg/L 及び 0.049 µg/L であった。河川水 100 mL に対象物質 0.010 µg 添加したときの回収率は 105% (変動係数 4.7%)、海水 100 mL に対象物質 0.050 µg 添加したときの回収率は 101% (変動係数 2.5%) であった。本分析法で福岡県内河川水及び海水を測定したところ、対象物質は検出されなかった。

以上の結果より、本法は、環境水試料中の 0.05 µg/L 程度のベンゾフェノ-4 の定量に適用可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) Rodil, R., Quintana, J.B., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D.: Multiclass Determination of Sunscreen Chemicals in Water Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **80**, 1307–1315 (2008).
- 2) Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E., Cela, R.: Solid-phase Extraction followed by Liquid chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Hydroxylated Benzophenone UV Absorbers in Environmental Water Samples, *Analytica Chimica Acta*, **654**, 162-170 (2009).

【担当者連絡先】

所属先名称 : 福岡県保健環境研究所

所属先住所 : 〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野 39

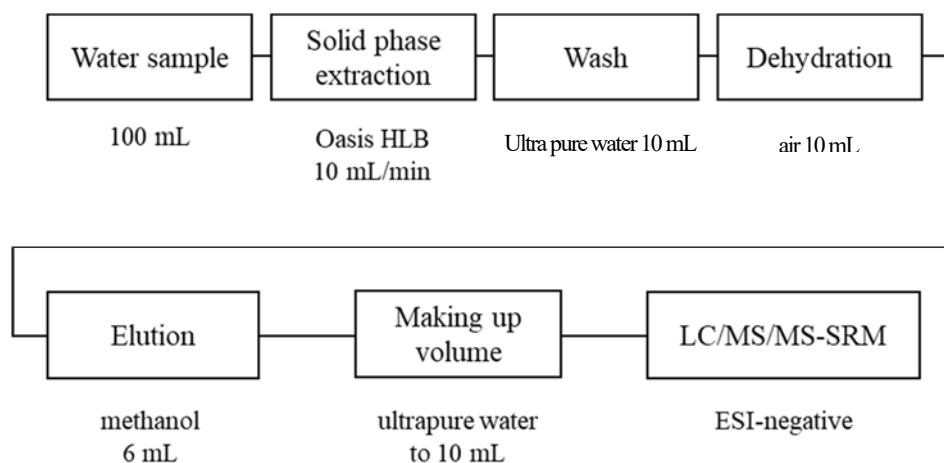
TEL : 092-921-9940 FAX 092-928-1203

担当者名 : 高橋 浩司

E-mail : takahashi@fihes.pref.fukuoka.jp

Benzophenone-4

This method provides procedures for the determination of benzophenone-4 in water samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). One hundred mL of water sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus) at a flow rate of 10 mL/min. After the cartridge is washed with 10 mL of ultrapure water, the benzophenone-4 is eluted with 6 mL of methanol through the cartridge. The eluate is then adjusted to 10 mL with ultrapure water for LC/MS/MS-SRM analysis. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) of benzophenone-4 are 0.019 and 0.049 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recovery ($n = 7$) from river water samples of 0.100 L each added with 0.010 μg was 105%, and the relative standard deviation (RSD) was 4.7%. The average recovery ($n = 5$) from sea water samples of 0.100 L each added with 0.050 μg was 101%, and the RSD was 2.5%.



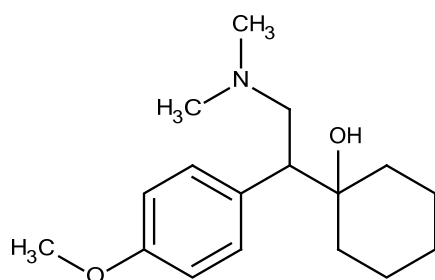
物質名	分析法フローチャート	備考
ベンゾフェノン-4 IUPAC 名： 5-ベンゾイル-4-ヒドロキシ-2-メトキシベンゼンスルホン酸 別名： 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン-5-スルホン酸、 オキシベンゾン-4、 スリソベンゾン	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 100 mL] --> B[固相抽出 Oasis HLB 流速 10 mL/min] B --> C[洗 浄 精製水 10 mL] C --> D[脱 水 注射器 空気 10 mL] D --> E[溶 出 メタノール 6 mL] E --> F[定 容 精製水 10 mL] F --> G[LC/MS/MS-SRM ESI(-)] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM 検出下限値： 【水質】 (µg/L) 0.019 分析条件： 機器 LC : Nexera X2 MS : LCMS-8050 カラム InertSustain C18 5 µm, 2.1 × 150 mm

ベンラファキシン

Venlafaxine

IUPAC 名：1-[2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]-cyclohexanol
1-[2-(ジメチルアミノ)-1-(4-メトキシフェニル)エチル]シクロヘキサノール

【対象物質の構造】



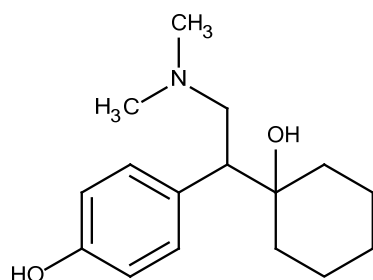
ベンラファキシン

CAS 番号：93413-69-5

(S 体) 93413-44-6

(R 体) 93413-46-8

分子式：C₁₇H₂₇NO₂



O-Desmethyl venlafaxine

(ベンラファキシン代謝物)

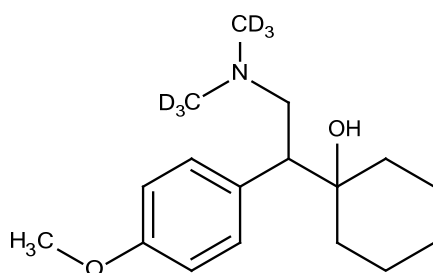
CAS 番号：93413-62-8

(S 体) 142761-12-4

(R 体) 142761-11-3

分子式：C₁₆H₂₅NO₂

【サロゲート内標準物質の構造】



ベンラファキシン-d₆

CAS 番号：1062606-12-5

分子式：C₁₇H₂₁D₆NO₂ · HCl

【物理化学的性状】

〔分子量〕	277.4
〔モノアイソトピック質量〕	277.2094
〔比重〕	データなし
〔沸点〕	データなし
〔融点〕	74-76°C ¹⁾
〔水溶解度〕	0.23 mg/mL ²⁾
〔蒸気圧〕	2.46×10^{-7} mm Hg (25°C) ¹⁾
〔log P _{ow} 〕	3.20 ¹⁾ 、 2.69 ²⁾
〔pKa〕	14.42(Strongest Acidic) ²⁾ 、 8.91(Strongest Basic) ²⁾

【毒性、用途等】**〔毒性〕**

〔実験動物に対する単回投与毒性試験〕 ³⁾

動物種	投与経路	概略の致死量 (mg/kg)
マウス	経口	雌雄 320
ラット	経口	雄 400、雌 280
イヌ	経口	雌雄 75

〔用途〕

医薬（抗うつ薬） ³⁾

出典

- 1) PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Venlafaxine#section=Physical-Description>)
- 2) Drug Bank (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00285>)
- 3) 医薬品インタビューフォーム「イフェクサーSR カプセル（37.5 mg、75 mg 錠）、ファイザー株式会社」より引用

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準物質としてベンラファキシン- d_6 を添加し、固相カートリッジに通水後、精製水及び 10%メタノールで洗浄した後、メタノール 5 mL で溶出し、精製水 5 mL を加えて LC/MS/MS-ESI-positive で分析する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

Venlafaxine hydrochloride	: Cerilliant 製 1.0 mg/mL (ベンラファキシンとして) (メタノール溶液)
(±)-O-Desmethyl venlafaxine	: Cerilliant 製 1.0 mg/mL (メタノール溶液) (注 1)
Venlafaxine- d_6 HCl	: Cerilliant 製 100 µg/mL (ベンラファキシン- d_6 として) (メタノール溶液)
メタノール	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
精製水	: 富士フイルム和光純薬製 超純水 LC/MS 用
ギ酸	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis HLB Plus Short Cartridge, 225 mg (注 2)

【標準液の調製】

〔標準液〕

市販の Venlafaxine hydrochloride 1.0 mg/mL (ベンラファキシンとして) (メタノール溶液) を標準原液とする。標準原液をメタノールで 10 倍希釈し、100 µg/mL のベンラファキシン標準液を作成する。

市販の(±)-O-desmethyl venlafaxine 1.0 mg/mL (メタノール溶液) を標準原液とする。標準原液をメタノールで 10 倍希釈し、100 µg/mL の O-desmethyl venlafaxine 標準液を作成する。

〔サロゲート内標準液〕

市販の Venlafaxine- d_6 HCl 100 µg/mL (ベンラファキシン- d_6 として) (メタノール溶液) をサロゲート内標準原液とする。サロゲート内標準原液をメタノールで

順次希釈して 100 ng/mL のサロゲート内標準液を調製する。

〔検量線用標準液〕（注 1）

ベンラファキシン標準液、O-desmethyl venlafaxine 標準液をメタノールで順次希釈して 0.0050～5.0 ng/mL の範囲の検量線用混合標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液にはサロゲート内標準の濃度が 1.0 ng/mL となるようにベンラファキシン-*d*₆を添加する。

【器具】

メスフラスコ、ホールピペット、メスフラスコ、パスツールピペット、マイクロシリンジ、コンセントレーター（注 3）

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って採取する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 100 mL に 100 ng/mL のサロゲート内標準液を 100 μL 添加し、予めメタノール 10 mL、精製水 10 mL の順にコンディショニングした固相カートリッジにコンセントレーターを用いて 10 mL/min で通水する。通水後、固相カートリッジを精製水 10 mL 及びメタノール/精製水(1:9) 10 mL で洗浄し、3500 rpm で 10 分間遠心分離を行い、窒素通気により 20 分間乾燥させる。メタノールを用いて 1 mL/min で 5 mL 溶出後、精製水で 10 mL に定容して試験液とする。

【空試験液の調製】

試料水と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 測定条件〕

〔LC 条件〕

使用機種	: 島津製作所製 LC-20 Series
カラム	: Waters 製 X-Bridge C18 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)
移動相	: A : 0.2%ギ酸、B : 0.2%ギ酸含有アセトニトリル

	0 →15 min	A : 80→10、 B : 20→90	linear gradient
	15→20 min	A : B=10 : 90	
	20→20.1 min	A : 10→80、 B : 90→20	linear gradient
	20.1→30 min	A : B=80 : 20	
カラム流量	:	0.2 mL/min	
カラム温度	:	40°C	
注入量	:	10 μL	

[MS 条件]

使用機種	: AB Sciex 製 QTRAP 4500
イオン化法	: ESI positive
ターボガス温度 (TEM)	: 700°C
カーテングス (CUR)	: 40 psi
イオンスプレー電圧 (IS)	: 5000 V
ネブライザーガス (GS1)	: 80 psi
ターボガス (GS2)	: 80 psi
コリジョンガス (CAD)	: 8 psi
モニターイオン, コリジョン電圧(CE)、ドリフト電圧(DP) :	
ベンラファキシン	: (定量) m/z 278.2 > 58.2 (CE 50 V , DP 50 V) (確認) m/z 278.2 > 121.2 (CE 40 V , DP 45 V)
O-Desmethyl venlafaxine	: (定量) m/z 264.2 > 58.2 (CE 46 V , DP 55 V) (確認) m/z 264.2 > 106.8 (CE 44 V , DP 55 V)
ベンラファキシン- d_6	: (定量) m/z 284.2 > 64.1 (CE 50 V , DP 55 V) (確認) m/z 284.2 > 121.0 (CE 40 V , DP 55 V)

2020(R2)調査において、0-Desmethyl venlafaxineの保持時間をより長くするLC条件として下記の事例が報告されている。

〔LC/MS/MS 測定条件〕

[LC 条件]

使用機種：島津製作所製 LC-20 Series

カラム : GL Sciences 製 Inert Sustain C18, 150 mm×2.1 mm, 3.0 μ m (UP)

移動相 : A:0.2%ギ酸、B:0.2%ギ酸含有アセトニトリル

0→1.5 min A : B = 85 : 15

1.5→10 min A : 85→10, B : 15→90 linear gradient

10→13 min A : B = 10 : 90

13→13.5 min A : 10→85, B : 90→15 linear gradient

13.5→20 min A : B = 85 : 15

カラム流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40℃

注入量：10 μ L

(2021(R3)精査等検討会コメント)

〔検量線〕

検量線用標準液10 μLをLC/MS/MSに注入し、ベンラファキシンは対象物質とサロゲート内標準物質の濃度比及び得られたピーク面積比から、O-desmethyl venlafaxineは対象物質の濃度及び得られたピーク面積から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 10 μL を LC/MS/MS に注入し、ベンラファキシンは対象物質とサロゲート内標準物質のピーク面積比を検量線に照らして定量する。O-Desmethyl venlafaxine は対象物質のピーク面積から検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

試料中の濃度 C (μg/L) は、次式により算出する。

$$\text{ベンラファキシン} : C (\mu\text{g/L}) = R \cdot Q/V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準物質に対する対象物質の濃度比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準物質の量 (μg)

(添加したサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の容量 (μL) / 1000)

V : 試料量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 0.010 (\mu\text{g})$$

(添加したサロゲート内標準液の濃度 (0.100 ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の容量 (100 μL) / 1000)

$$V = 0.10 (\text{L})$$

即ち、

$$C = R \times 0.10 (\mu\text{g/L})$$

である。

O-Desmethyl venlafaxine :

$$C (\mu\text{g/L}) = \text{検出濃度}(\text{ng/mL}) \times (\text{最終液量}(\text{mL}) / \text{試料量}(\text{L})) \times 1/1000$$

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す (注 4)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (µg/L)
ベンラファキシン	0.012	0.10	10	0.00012
O-Desmethyl venlafaxine	0.017	0.10	10	0.00017

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す（注 5）。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
ベンラファキシン	0.10	10	0.00024	0.00062
O-Desmethyl venlafaxine	0.10	10	0.00033	0.00085

注 解

- （注 1）O-Desmethyl venlafaxine の試薬の中には少量のベンラファキシンを含んでいる場合がある。混合標準液とする場合は、予め O-desmethyl venlafaxine の中のベンラファキシン含有量を調べ、濃度をその分上乗せして計算を行うことが望ましい。今回使用した O-desmethyl venlafaxine は 0.3% のベンラファキシンを含有しており、以下全てにおいて、その分濃度を上乗せして計算を行っている。
- （注 2）ここで示す製品は実際に使用した商品を掲げたが、これらを推奨するわけではなく、これらと同等以上の品質、性能のものをを用いても問題ない。
- （注 3）JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用する。マイクロシリンジを使用する場合には精度管理ないしはバリデーションされたものを用いることを基本とし、測定誤差 2% 以下となることを担保しておくのが望ましい。

(注 4) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に準じて、以下の表 3 のとおり算出した。また測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	ベンラファキシン	O-Desmethyl venlafaxine
試料量 (L)	0.10	0.10
最終液量 (mL)	10	10
注入液濃度 (ng/mL)*	0.0050	0.0050
注入量 (pg)	0.050	0.050
装置注入量 (μL)	10	10
結果 1 (pg)	0.0542	0.0619
結果 2 (pg)	0.0494	0.0657
結果 3 (pg)	0.0497	0.0566
結果 4 (pg)	0.0561	0.0560
結果 5 (pg)	0.0571	0.0536
結果 6 (pg)	0.0533	0.0620
結果 7 (pg)	0.0557	0.0561
平均値 (pg)	0.05364	0.05884
標準偏差(σ_{n-1}) (pg)	0.00306	0.00437
IDL (pg)*	0.012	0.017
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.00012	0.00017
S/N 比	8.9	9.7
CV(%)	5.7	7.4

* : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

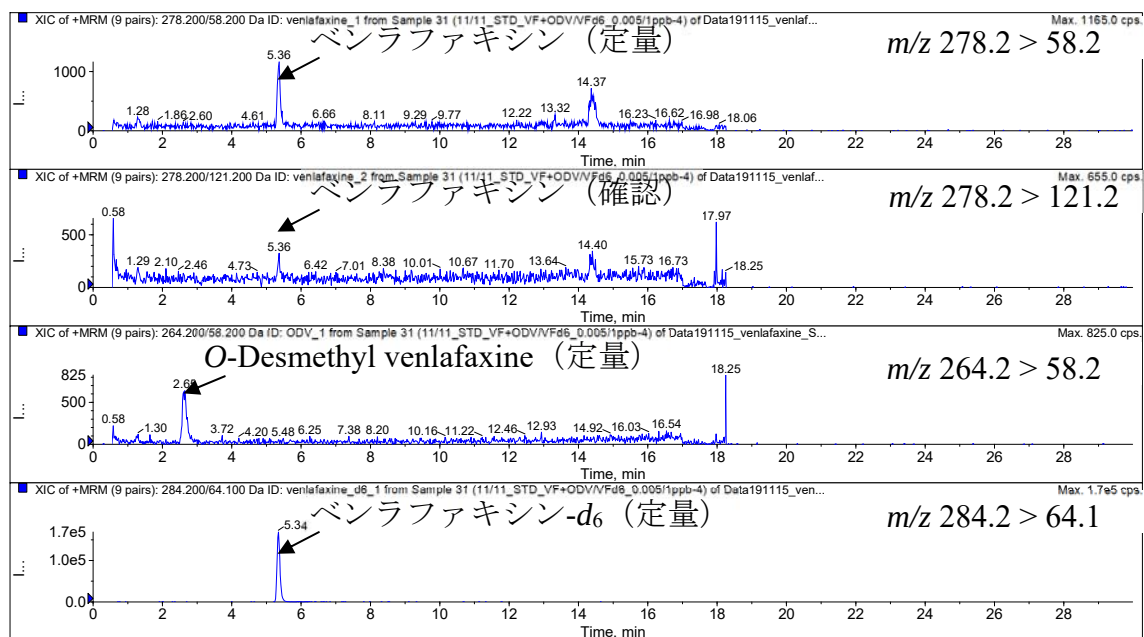


図1 IDL 測定時の SRM クロマトグラム
 (ベンラファキシン : 0.0050 ng/mL、O-desmethyl venlafaxine : 0.0050
 ng/mL、サロゲート内標準ベンラファキシン-d₆ : 1.0 ng/mL)

(注 5) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)により、表 4 のとおり算出した。また図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示した。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

対象物質名	ベンラファキシン ^{*1}	回収率 (%) ^{*1}	ベンラファキ シン-d ₆ 回 収率(%)	O-Desmethyl venlafaxine ^{*2}	回収率 (%) ^{*2}
試料	河川水			河川水	
試料量 (L)	0.10			0.10	
標準添加量 (ng)	0.30			0.30	
試料換算濃度 (µg/L)	0.0030			0.0030	
最終液量 (mL)	10			10	
注入濃度 (µg/L)	0.030			0.030	
装置注入量 (µL)	10			10	
操作ブランク平均 (µg/L) ^{*3}	<0.00024	-	-	<0.00033	-
無添加平均 (µg/L) ^{*4}	<0.00024	-	-	<0.00033	-
結果 1 (µg/L)	0.00271	90.0	93.0	0.00255	85.1
結果 2 (µg/L)	0.00272	90.5	101	0.00257	85.5
結果 3 (µg/L)	0.00274	91.0	97.5	0.00270	89.9
結果 4 (µg/L)	0.00268	89.2	96.0	0.00246	82.2
結果 5 (µg/L)	0.00286	95.0	97.9	0.00270	90.1
結果 6 (µg/L)	0.00268	88.9	97.1	0.00261	87.1
結果 7 (µg/L)	0.00275	91.4	97.5	0.00262	87.3
平均値 (µg/L)	0.002734	90.9	97.1	0.002601	86.7
標準偏差 (σ _{n-1}) (µg/L)	0.0000616			0.0000851	
MDL (µg/L) ^{*5}	0.00024			0.00033	
MQL (µg/L) ^{*6}	0.00062			0.00085	
S/N 比	49			59	
CV(%)	2.3			3.3	

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 定量結果は、絶対検量による分析値である。

*3 : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*4 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*5 : MDL = t (n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2

*6 : MQL = σ_{n-1} × 10

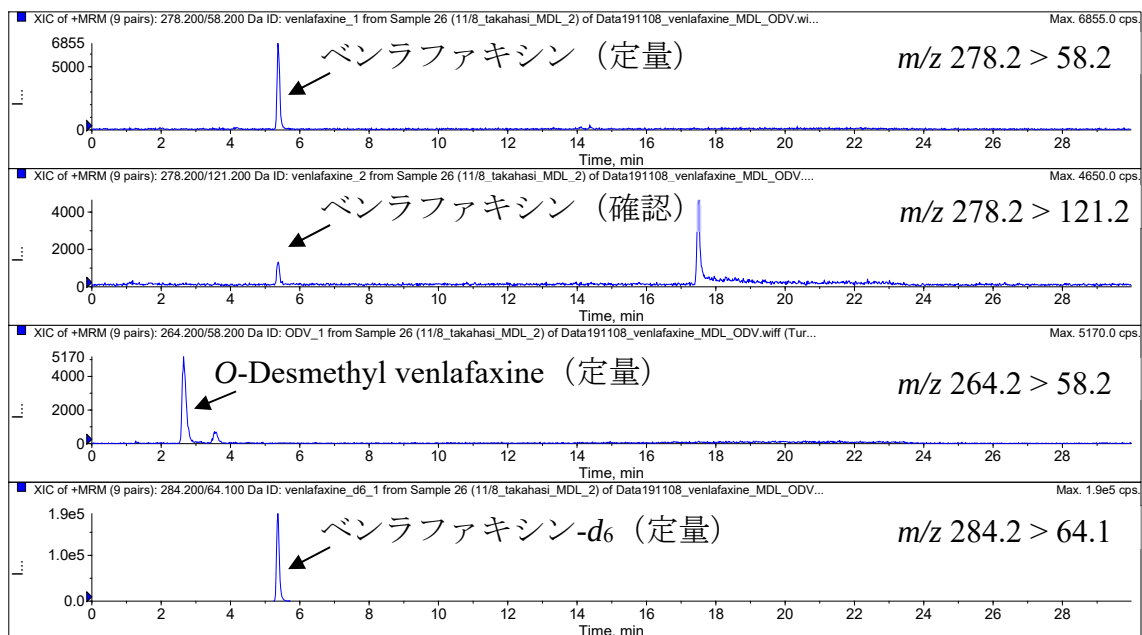


図2 MDL 測定時のクロマトグラム
 (河川水：試料換算濃度 ベンラファキシン：0.030 $\mu\text{g/L}$ 、O-desmethyl
 venlafaxine：0.030 $\mu\text{g/L}$)

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

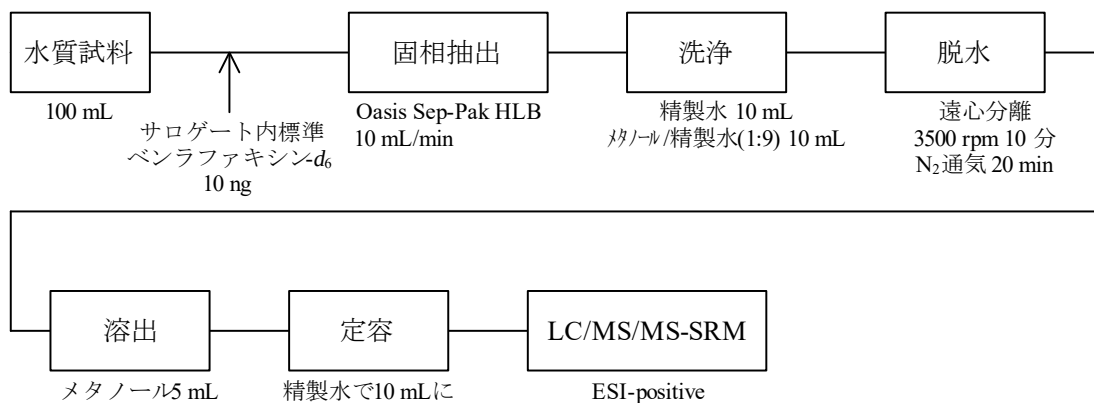


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図4-1及び図4-2に、検量線作成用データを表5-1及び表5-2に示す。

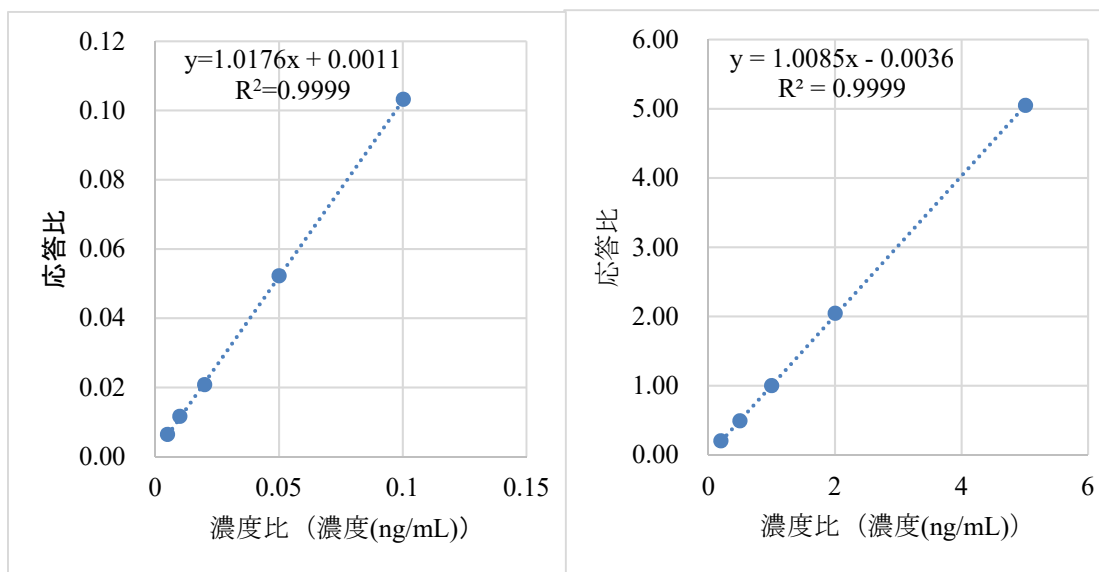


図 4-1 ベンラファキシン検量線
(左図：低濃度検量線 0.0050～0.10 ng/mL、右図：高濃度検量線 0.20～5.0 ng/mL、サロゲート内標準：1.0 ng/mL)

表 5-1 検量線作成用データ (ベンラファキシン)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質(As)	サロゲート内標準物質(Ais)	
		[ベンラファキシン] (m/z 278 > 58)	[ベンラファキシン- <i>d</i> ₆] [*] (m/z 284 > 64)	
0.0050	0.0050	6515	1020612	0.00638
0.010	0.010	12165	1047855	0.0116
0.020	0.020	21377	1029286	0.0208
0.050	0.050	53793	1030778	0.0522
0.10	0.10	106944	1036526	0.103
0.20	0.20	211396	1045474	0.202
0.50	0.50	504031	1030353	0.489
1.0	1.0	1050466	1051262	0.999
2.0	2.0	2059793	1007363	2.04
5.0	5.0	4992266	989216	5.05

* : サロゲート内標準物質濃度：1.0 ng/mL (Cis)

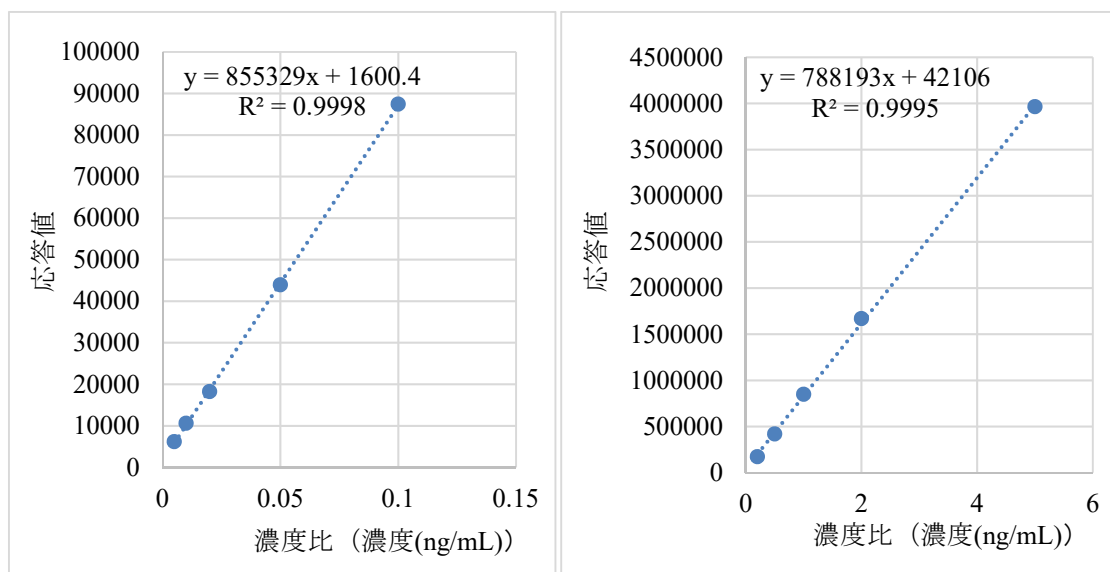


図 4-2 O-Desmethyl venlafaxine 検量線
(左図：低濃度検量線 0.0050～0.10 ng/mL 、
右図：高濃度検量線 0.20～5.0 ng/mL)

表 5-2 検量線作成用データ(O-Desmethyl venlafaxine)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値
	対象物質(As)
	[O-Desmethyl venlafaxine] (m/z 264/58)
0.0050	6140
0.010	10572
0.020	18216
0.050	43900
0.10	87410
0.20	171166
0.50	417849
1.0	847796
2.0	1668418
5.0	3962579

〔クロマトグラム〕

標準液の SRM クロマトグラムを図 5 に示す。

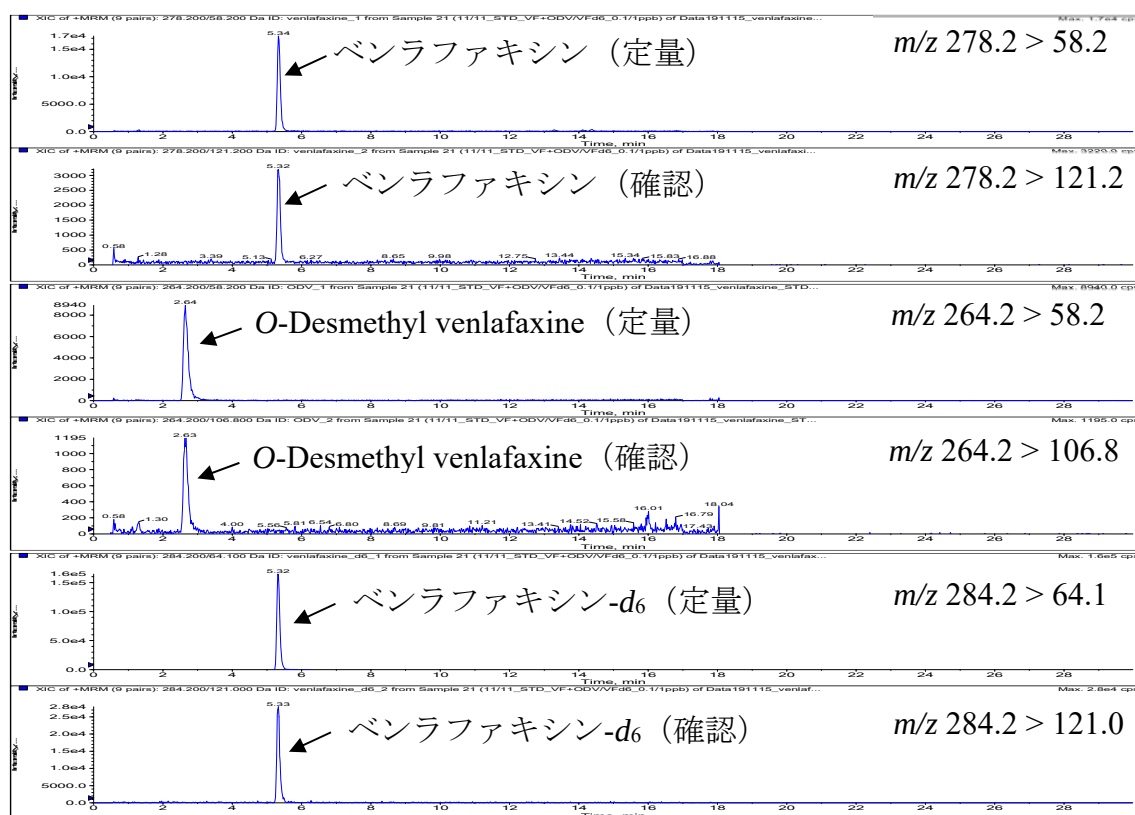


図 5 標準液の SRM クロマトグラム

(ベンラファキシン 0.10 ng/mL、O-desmethyl venlafaxine : 0.10 ng/mL、
サロゲート内標準ベンラファキシン- d_6 : 1.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

ベンラファキシン、ベンラファキシン- d_6 及び O-desmethyl venlafaxine のマススペクトル並びにプレカーサーイオン m/z 278.2、 m/z 284.2 及び m/z 264.2 に対するプロダクトイオンを図 6-1～6-3 に示す。

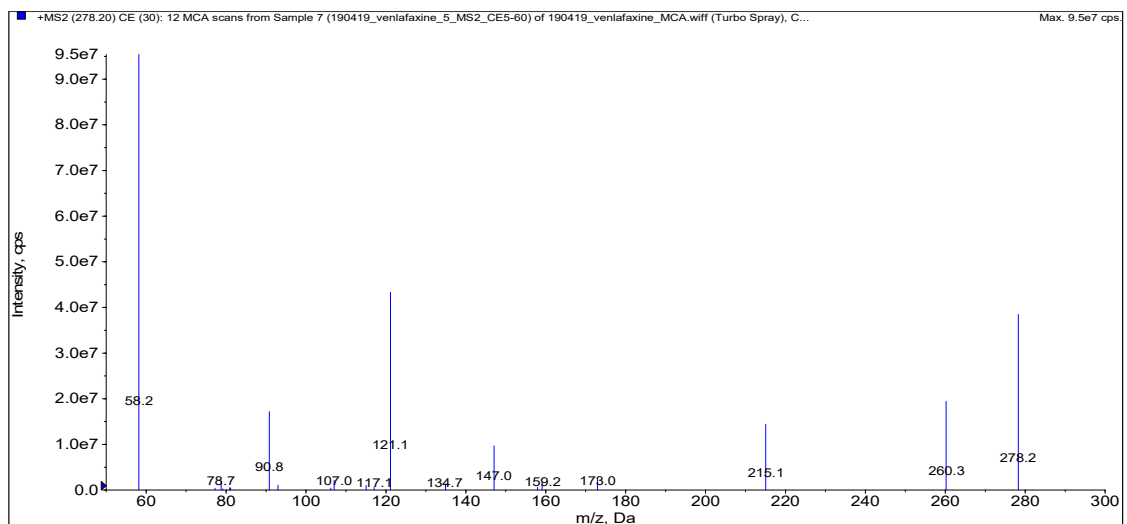
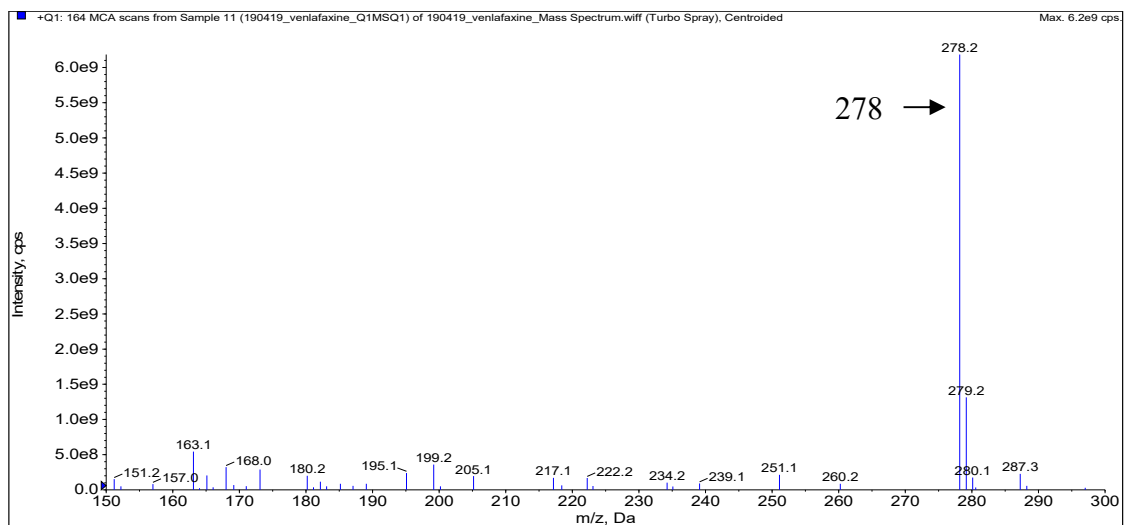


図 6-1 ベンラファキシンのマススペクトル（上図）及びプレカーサーイオン及び m/z 278.2 に対するプロダクトイオン（下図）

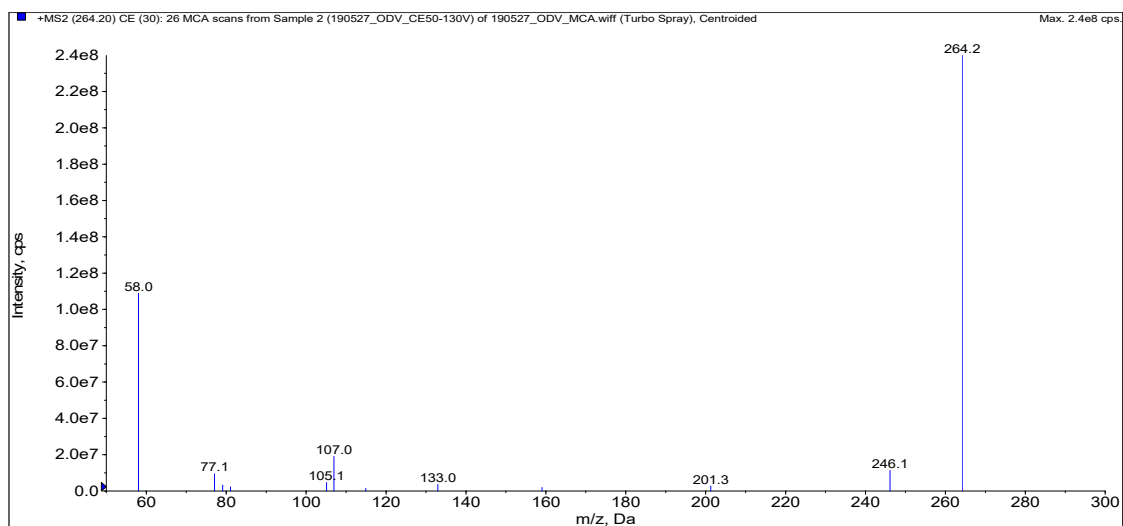
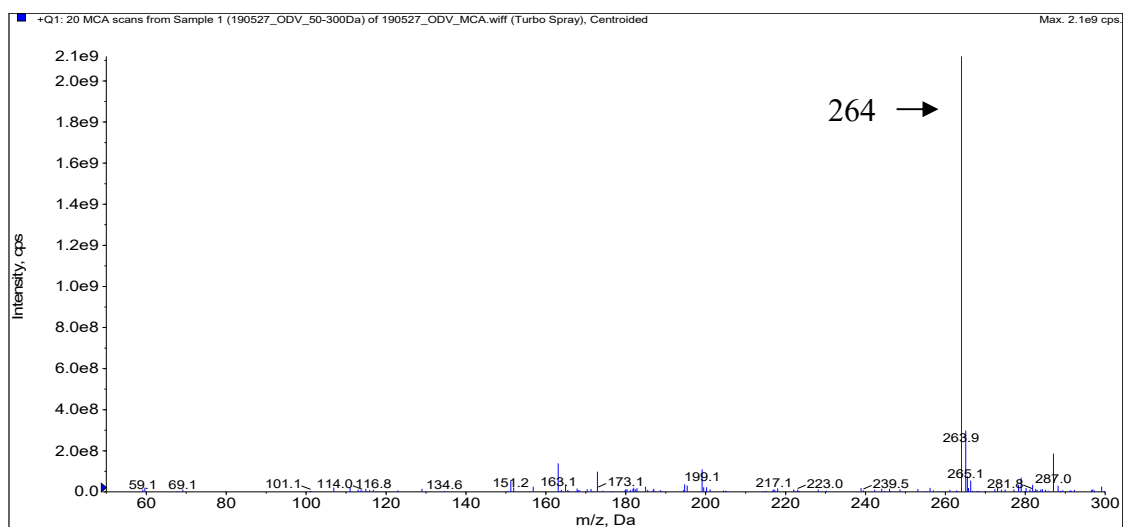


図 6-2 ベンラファキシン代謝物(*O*-desmethyl venlafaxine)のマスペクトル（上図）及びプレカーサーイオン m/z 264.2 に対するプロダクトイオン（下図）

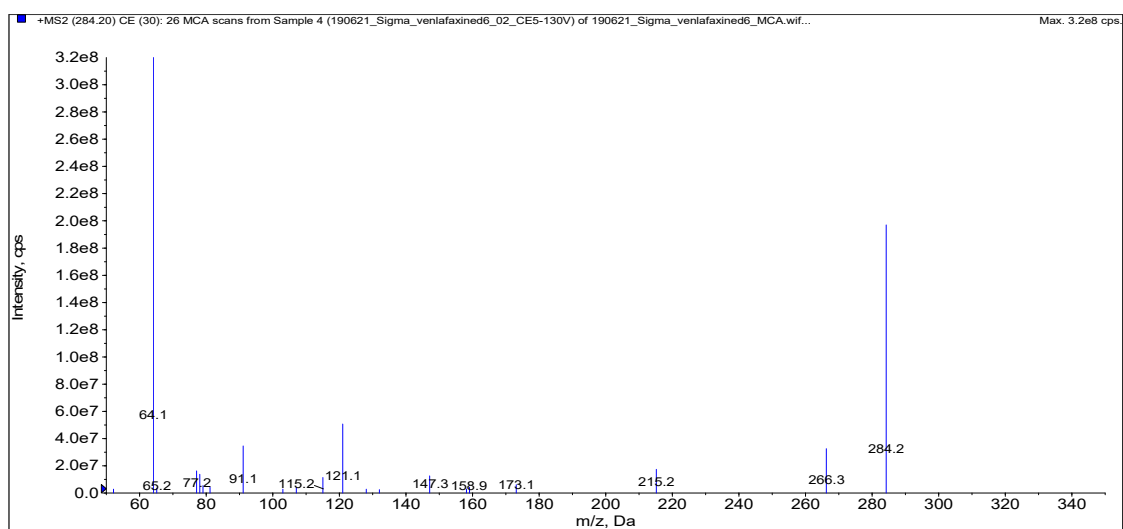
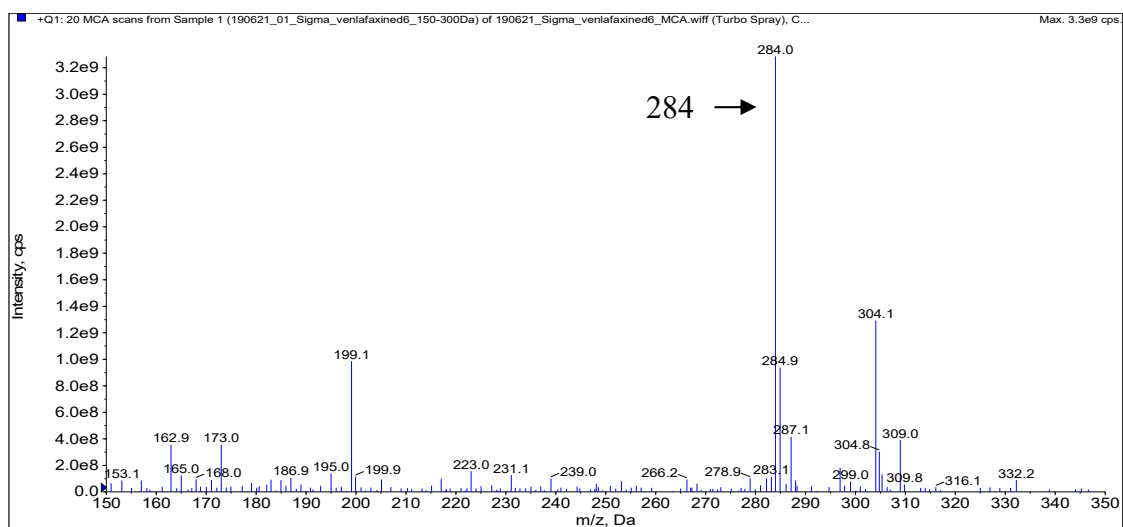


図 6-3 ベンラファキシン- d_6 のマススペクトル（上図）及び
プレカーサーイオン m/z 284.2 に対するプロダクトイオン（下図）

〔操作ブランク試験〕

精製水 100 mL にサロゲート内標準物質としてベンラファキシン- d_6 を 10 ng 添加して操作ブランクを測定した時のクロマトグラフを図 7 に示す。操作ブランクは MDL 未満であった。

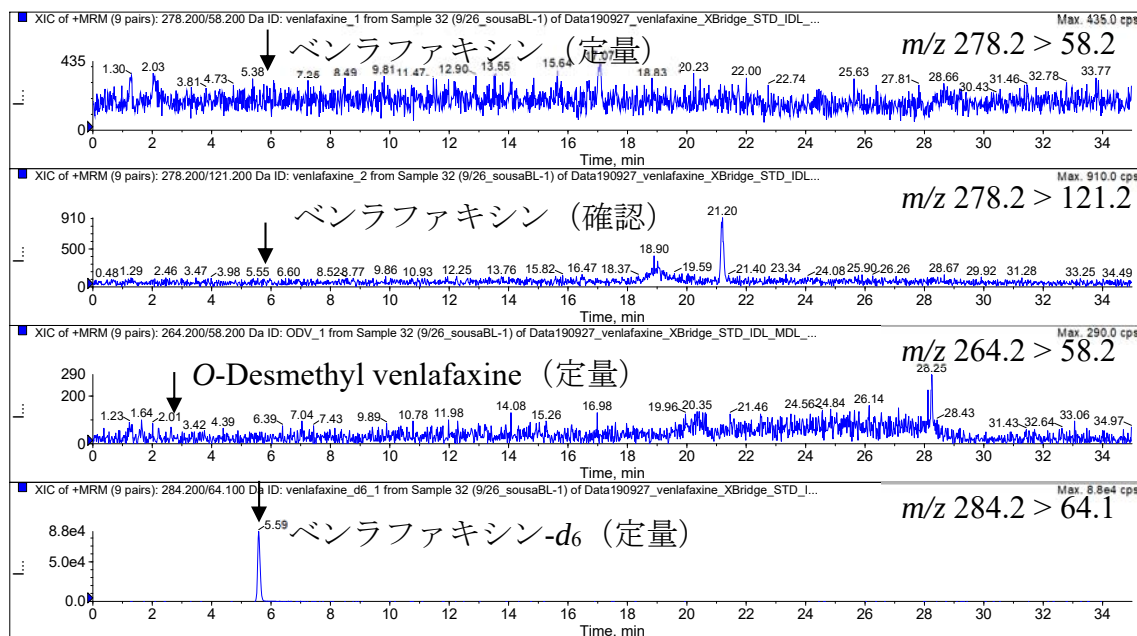


図 7 操作ブランクのクロマトグラム (ベンラファキシン- d_6 : 1.0 ng/mL)

〔添加回収試験〕

河川水（石川）及び海水（大阪湾）への添加回収試験結果を表 6 に示す。また、添加回収試験時のクロマトグラムを図 8-1、8-2 及び図 9-1、9-2 に示す。

表 6 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度* (µg/L)	回収率* (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率(%)
河川水	ベンラファキ	0.10	0	2	<0.00024	-	-	83
	シン	0.10	1.0	5	0.0108	110	2.9	85
	O-Desmethyl	0.10	0	2	0.0030	-	-	-
	venlafaxine	0.10	1.0	5	0.0124	94	1.6	-
海水	ベンラファキ	0.10	0	2	0.0014	-	-	89
	シン	0.10	1.0	5	0.0114	100	4.3	88
	O-Desmethyl	0.10	0	2	0.0020	-	-	-
	venlafaxine	0.10	1.0	5	0.0109	89	1.3	-

* : ベンラファキシンの検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値、
O-desmethyl venlafaxine は絶対検量線法による値

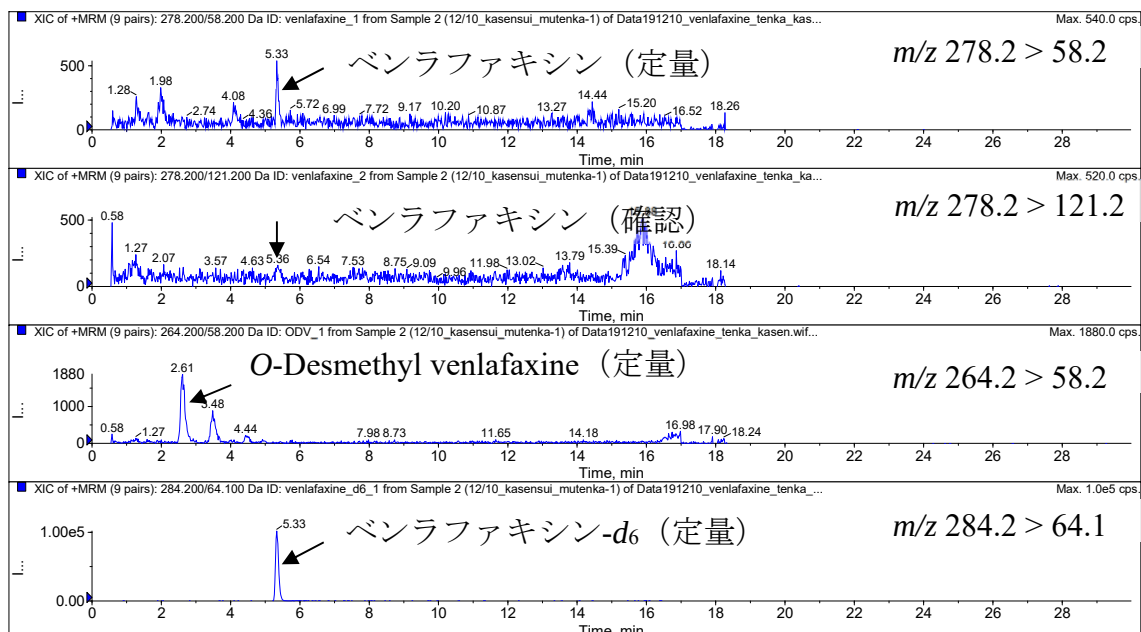


図 8-1 添加回収試験のクロマトグラム (河川水：無添加)

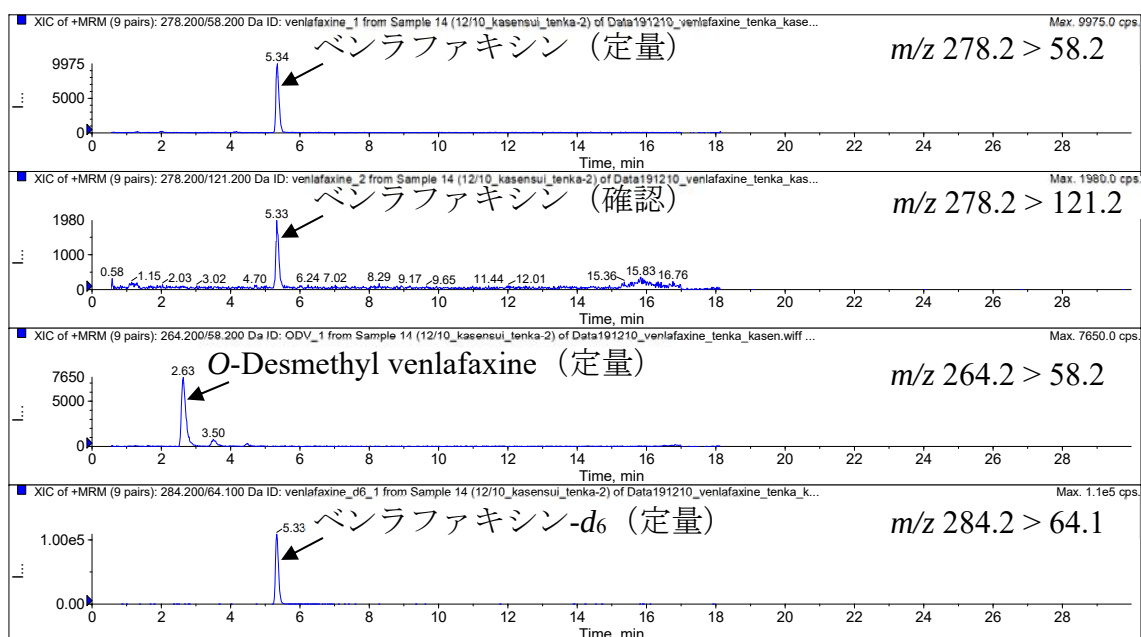


図 8-2 添加回収試験のクロマトグラム (河川水：添加濃度 0.01 ng/mL)

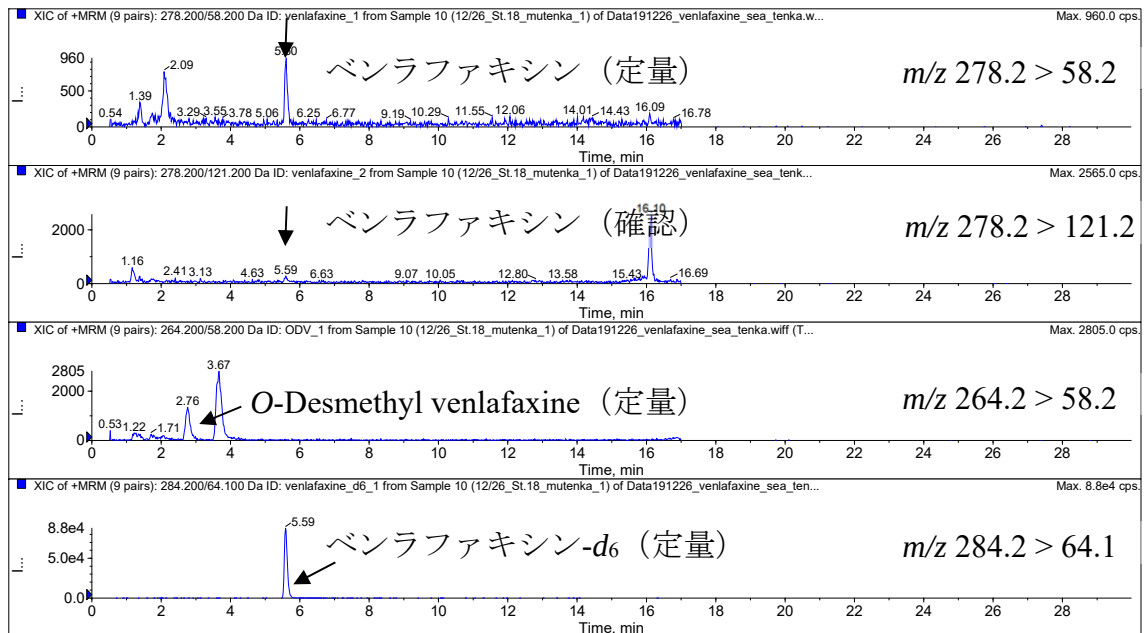


図 9-1 添加回収試験のクロマトグラム (海水：無添加)

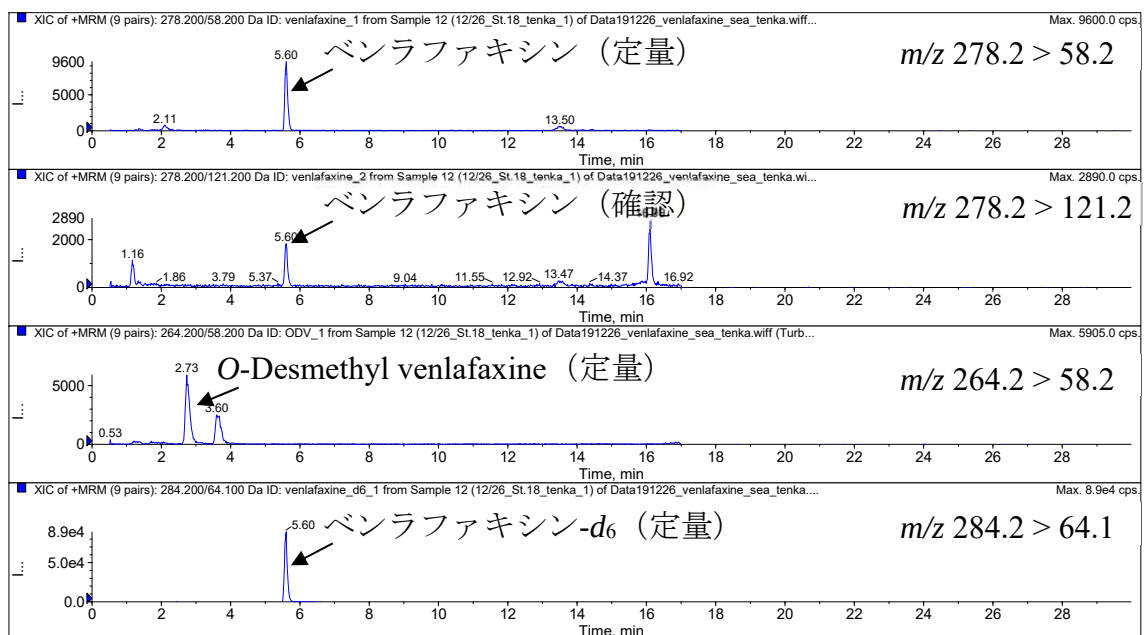


図 9-2 添加回収試験のクロマトグラム (海水：添加濃度 0.01 ng/mL)

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 7 に示す。pH を 5、7、9 に調製した溶液にベンラファキシン及び *O*-desmethyl venlafaxine を添加して、1 時間後及び 7 日後にサロゲート内標準を添加して前処理を行い、測定を行った。

表 7 分解性スクリーニング結果

物質名	pH ^{*2}	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%) ^{*1})		
				1 時間放置後	7 日間放置後	
					暗所	明所
ベンラファ キシン	5	2	0.010	0.00945(94)	0.00918(92)	-
	7	2	0.010	0.0102(102)	0.00918(92)	0.00906(90)
	9	2	0.010	0.0101(101)	0.00924(92)	-
<i>O</i> -Desmeth yl venlafaxi ne	5	2	0.010	0.0103(103)	0.0103(103)	-
	7	2	0.010	0.0103(103)	0.0106(106)	0.0106(106)
	9	2	0.010	0.0107(107)	0.0101(101)	-

*1 : 調製濃度に対する検出濃度の割合 (ベンラファキシン : サロゲート補正後の値、*O*-desmethyl venlafaxine : 絶対検量線法による値)

*2 : 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液を精製水で作成し、その後 1% ギ酸及び 1% アンモニア水で pH5、7、9 に調製した。

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 8-1～8-2 に示す。

河川水、海水の保存性試験は各試料水 100 mL にベンラファキシン及び *O*-desmethyl venlafaxine 1.0 ng を添加して、1 時間後 (当日) と 7 日後にサロゲート内標準 (ベンラファキシン-*d*₆) を 10 ng 添加し、前処理して測定した。

粗抽出液の保存性試験は、添加回収試験を行ったときの固相抽出液 5 mL をポリプロピレンバイアルに入れ、冷蔵保存した。海水は 14 日後、河川水は 2 ヶ月後に各粗抽出液に 5 mL の精製水を加えて測定を行った。

標準液については検量線用標準液をポリプロピレン製バイアルに入れて、冷蔵庫で保存し、1 ヶ月後に測定した。

ベンラファキシンについて試料の保存性試験はサロゲート補正を行い、粗抽出液及び標準液の保存性試験は絶対検量線法とした。また *O*-desmethyl venlafaxine は全て絶対検量線法で求めた。

いずれも保存性に特に問題は見られなかった。

表 8-1 保存安定性試験結果（ベンラファキシン）

試料名		調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%) ^{*1} ）				
			1 時間	7 日間	14 日間	1 ヶ月	2 ヶ月
河川水	試料	0.010	0.0106 (106)	0.00972 (97)	-	-	-
	粗抽出液	0.010	-	-	-	-	0.00963 (96)
海水	試料	0.010	0.0101 (101)	0.0102 (102)	-	-	-
	粗抽出液	0.010	-	-	0.00900 (90)	-	-
標準液	検量線 最低濃度	0.0050	-	-	-	0.00460 (92)	-
	検量線 最高濃度	5.0	-	-	-	4.83 (96)	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 8-2 保存安定性試験結果（O-Desmethyl venlafaxine）

試料名		調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%) [*] ）				
			1 時間	7 日間	14 日間	1 ヶ月	2 ヶ月
河川水	試料	0.010	0.00938 (94)	0.00954 (95)	-	-	-
	粗抽出液	0.010	-	-	-	-	0.00964 (96)
海水	試料	0.010	0.00884 (88)	0.00931 (93)	-	-	-
	粗抽出液	0.010	-	-	0.0102 (102)	-	-
標準液	検量線 最低濃度	0.0050	-	-	-	0.00451 (90)	-
	検量線 最高濃度	5.0	-	-	-	5.05 (101)	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔環境試料の分析〕

本法を用いて大阪府内の環境試料を測定した結果、ベンラファキシン及び O-desmethyl venlafaxine は河川水（寝屋川）で 0.028 µg/L 及び 0.052 µg/L（図

10)、海水（大阪湾）で 0.0014 $\mu\text{g/L}$ 及び 0.0020 $\mu\text{g/L}$ （前述の図 9-1）が検出された。

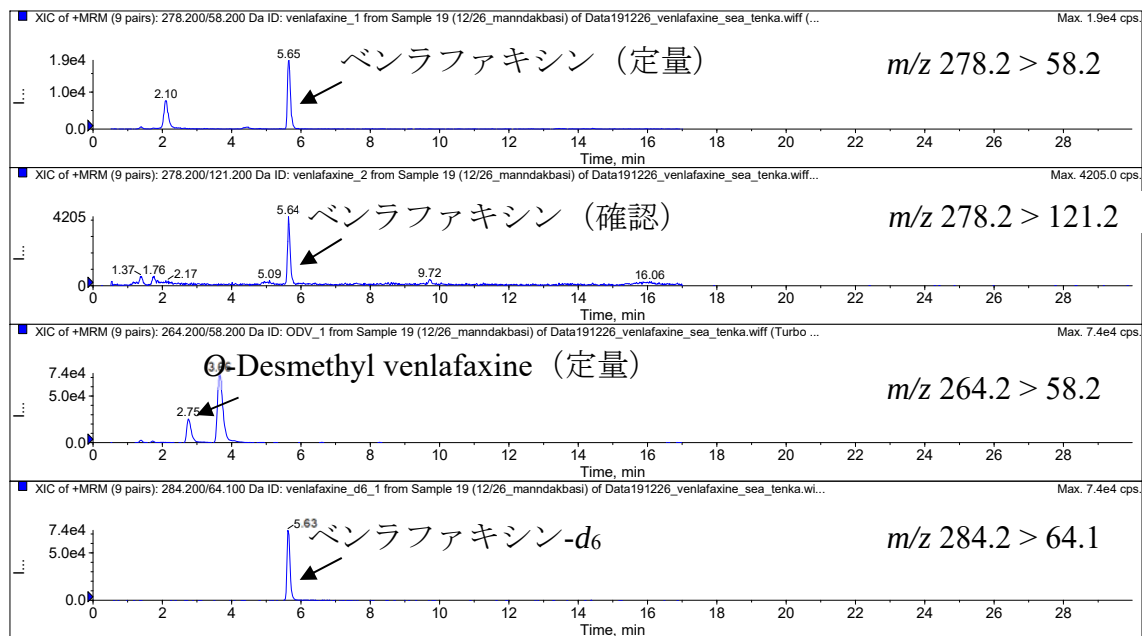


図 10 河川水（寝屋川）のクロマトグラム

【参考資料】

ベンラファキシンは *R*-体、*S*-体の光学異性体があるため、各光学異性体を分析対象とした分析法を検討した。

使用した光学異性体標準試薬及び LC 条件は以下のとおりである。以外の試薬及び MS 条件は【試薬】及び【LC/MS/MS】に記載のとおりである。

【光学異性体標準試薬】（注 6）

R-ベンラファキシン : Tront Research Chemicals 製 *R*-venlafaxine 純度 98%

S-ベンラファキシン : Tront Research Chemicals 製 *S*-venlafaxine 純度 98%

〔LC 条件〕

使用機種 : 島津製作所製 LC-20 Series

カラム : Agilent 製 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V
(100×2.1 mm, 2.7 µm)

移動相 : A : -

B : 0.01%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液

: 0 → 15 min A : B = 0 : 100 (Isocratic)

カラム流量 : 0.1 mL/min

カラム温度 : 25°C

注入量 : 10 µL

〔光学異性体の分離〕

ベンラファキシンは *R*-体、*S*-体の光学異性体があるため、光学異性体のカラム分離について、移動相及びグラジエント条件（検討 1）、標準液の溶媒組成（検討 2）の検討を行った。

表 9-1 に移動相及びグラジエント条件（移動相 1～3）を示す。表 9-2 に各移動相・グラジエント条件における標準液の溶媒組成(No.1～10)による分離の影響についての結果を示す。移動相 1 の条件では、移動相と同一の溶媒組成(No. 9)の標準液を使用しても良好な分離は得られなかった。移動相 2 及び移動相 3 の条件では、溶媒組成 No.7 以外では全て良好な分離が得られた。そこで【分析法】〔フローチャート〕の最終試験液と同じ溶媒組成 No.2 (50%メタノール水溶液) で測定することとした。図 10 にグラジエント条件（移動相 2）における代表的なクロマトグラムを示す。

表 9-1 移動相及びグラジエント条件 (検討 1)

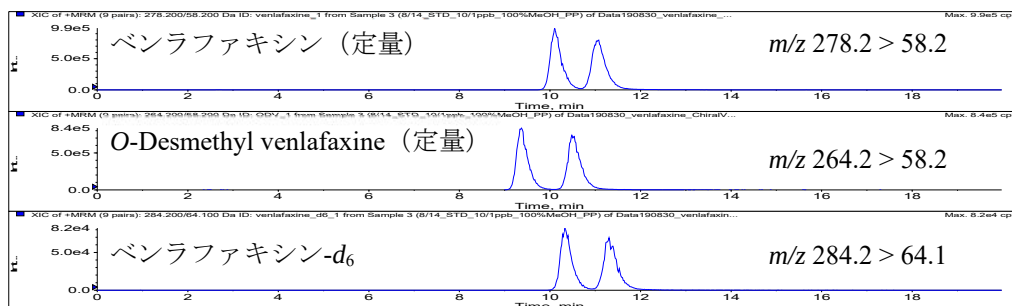
移動相 1	A ; - , B ; 0.005%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液 0→15 min A:B=0:100 (Isocratic)
移動相 2	A ; - , B ; 0.01%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液 0→15 min A:B=0:100 (Isocratic)
移動相 3	A ; 0.2%ギ酸水溶液 B ; 0.01%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液 0→15 min A:B=1:99 (Isocratic)

表 9-2 溶媒組成及び分離状況の結果 (検討 1 及び 2)

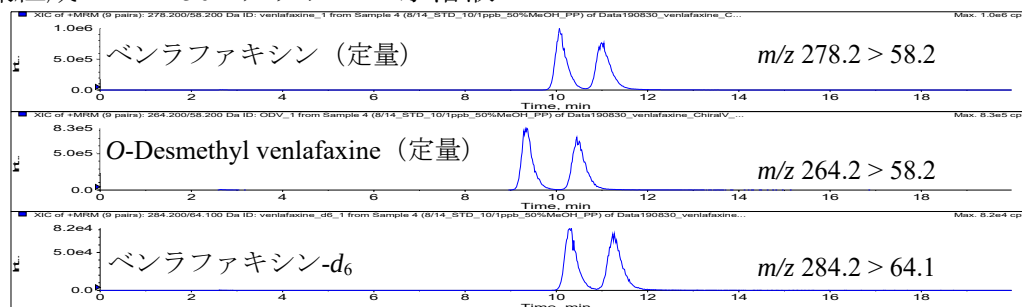
No.	標準液の溶媒組成	移動相	移動相	移動相
		1	2	3
1	MeOH 溶液	△	○	○
2	50%MeOH 水溶液	×	○	○
3	ACN 溶液	△	○	○
4	20%ACN 水溶液	×	○	○
5	0.2%ギ酸 MeOH 溶液	×	○	○
6	0.2%ギ酸/50%MeOH 水溶液	△	○	○
7	0.2%ギ酸/ACN	×	×	×
8	0.2%ギ酸/20%ACN 水溶液	△	○	○
9	0.005%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液	△	○	○
10	0.01%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液	-	○	○

○ : 分離良、△ : 分離可、× : 分離不可

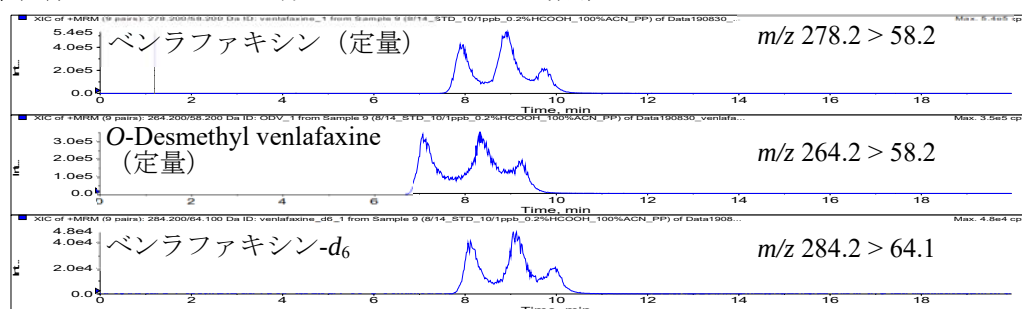
溶媒組成 No.1：メタノール溶液



溶媒組成 No.2：50%メタノール水溶液



溶媒組成 No.7：0.2%ギ酸/アセトニトリル溶液



溶媒組成 No.10：0.01%ギ酸/4 mmol/L 酢酸アンモニウム MeOH 溶液

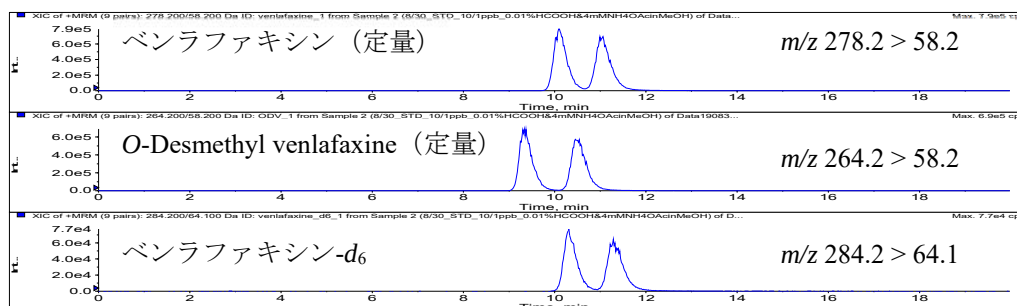


図 11 移動相 2 における各溶媒組成によるクロマトグラムの例
(ベンラファキシン：10.0 ng/mL、O-desmethyl venlafaxine：10.0 ng/mL、内標
準ベンラファキシン-d₆：10.0 ng/mL)

〔*R* 体、*S* 体の保持時間及び標準物質の濃度〕

Tront Research Chemicals 製の *R*-ベンラファキシン及び *S*-ベンラファキシンを用いて、*R* 体と *S* 体の保持時間及びピーク面積の応答値を求めた。各光学異性体の濃度はそれぞれ 0.10 ng/mL に調製して測定した。保持時間は *S* 体が 7.16 分、*R* 体が 7.71 分であり、面積値の結果を表 10 に示した。また *R* 体と *S* 体の混合物である Cerilliant 製のベンラファキシン標準品を 0.20 ng/mL に調製して測定したところ、*R* 体 47.7%、*S* 体 50.3%（面積値）であり、Cerilliant 製ベンラファキシン標準品は *R* 体と *S* 体の等量混合物であることが分かった。Cerilliant 製の (±)-*O*-desmethyl venlafaxine 及びベンラファキシン-*d*₆ も同様に *R* 体と *S* 体の等量混合物であることが分かった（図 12 (d)、12 (e)）。以降の分析法の検討には、Cerilliant 製のベンラファキシン標準品、ベンラファキシン-*d*₆、(±)-*O*-desmethyl venlafaxine を使用した。

表 10 DL 混合体及び *R* 体、*S* 体の面積値

標準物質	面積値	
	<i>S</i> -ベンラファキシン	<i>R</i> -ベンラファキシン
Cerilliant 製 ベンラファキシン 0.20 ng/mL	229338 (50.3%)	226980 (47.7%)
Tront Research Chemicals 製 <i>R</i> -ベンラファキシン 0.10 ng/mL	7735 (2.6%)	285712 (97.4%)
Tront Research Chemicals 製 <i>S</i> -ベンラファキシン 0.10 ng/mL	274528 (96.9%)	8761 (3.1%)

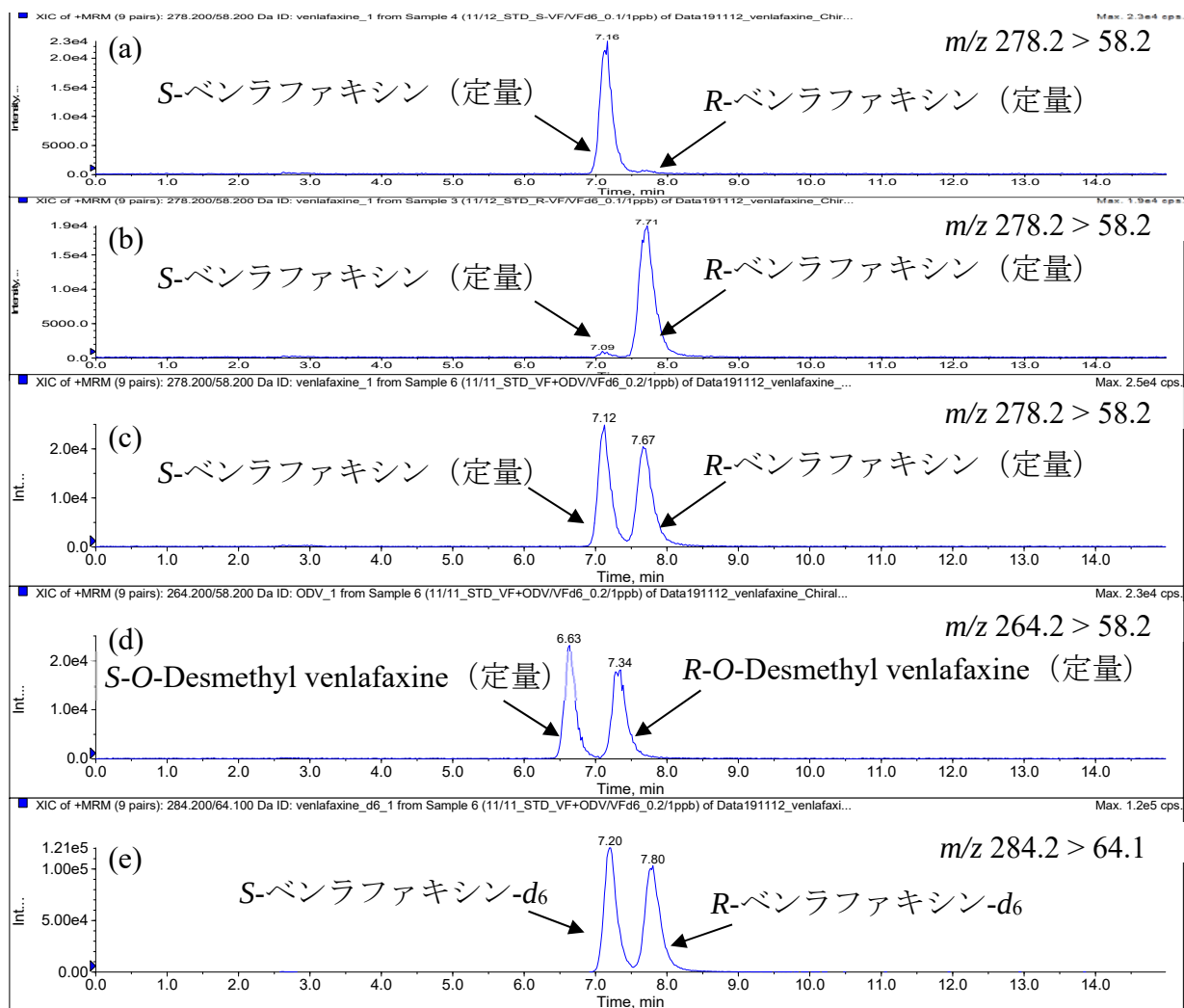


図 12 (a)Tront Research Chemicals 製 S-ベンラファキシン(0.10 ng/mL)
 (b)Tront Research Chemicals 製 R-ベンラファキシン(0.10 ng/mL)
 (c)Cerilliant 製 ベンラファキシン(0.20 ng/mL)
 (d)Cerilliant 製 (±)-O-desmethyl venlafaxine (0.20 ng/mL)
 (e)Cerilliant 製 ベンラファキシン- d_6 (1.0 ng/mL)

〔光学異性体毎の装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 11 に示す (注 7)

表 11 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (µg/L)
S-ベンラファキシン	0.012	0.10	10.0	0.00012
S-O-Desmethyl venlafaxine	0.016	0.10	10.0	0.00016
R-ベンラファキシン	0.025	0.10	10.0	0.00025
R-O-Desmethyl venlafaxine	0.012	0.10	10.0	0.00012

〔光学異性体毎の分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 12 に示す (注 8)。

表 12 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
S-ベンラファキシン	0.10	10.0	0.00022	0.00057
S-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	10.0	0.00013	0.00034
R-ベンラファキシン	0.10	10.0	0.00017	0.00044
R-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	10.0	0.00028	0.00072

(注 6) 保持時間及びピーク面積の応答値を調べるために Tront Research Chemicals 製の R-、S-ベンラファキシンを使用した。Cerilliant 製のベンラファキシンは R 体と S 体の等量混合物であることが分かったため、以降の分析法の検討では Cerilliant 製のベンラファキシンを用いた。

(注 7) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に準じて、以下の表 13 のとおり算出した。また測定時のクロマトグラムを図 13 に示す。

表 13 光学異性体毎の IDL の算出結果（詳細）

物質名	S-ベンラファ キシン	S-O-Desmethyl venlafaxine	R-ベンラファ キシン	R-O-Desmethyl venlafaxine
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10	0.10
最終液量 (mL)	10	10	10	10
注入液濃度 (ng/mL)	0.010	0.010	0.010	0.010
注入量 (pg)	0.10	0.10	0.10	0.10
装置注入量 (μL)	10	10	10	10
結果 1 (pg)	0.0940	0.109	0.0978	0.113
結果 2 (pg)	0.0944	0.102	0.0872	0.115
結果 3 (pg)	0.0992	0.108	0.0954	0.120
結果 4 (pg)	0.0955	0.110	0.0989	0.121
結果 5 (pg)	0.0937	0.108	0.0842	0.120
結果 6 (pg)	0.0901	0.108	0.101	0.113
結果 7 (pg)	0.0907	0.0993	0.0991	0.118
平均値 (pg)	0.09395	0.1064	0.09484	0.1172
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.00305	0.00419	0.00656	0.00309
IDL (pg) ^{*1}	0.012	0.016	0.025	0.012
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.00012	0.00016	0.00025	0.00012
S/N	15	14	15	13
CV (%)	3.2	3.9	6.9	2.6

*1 : IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

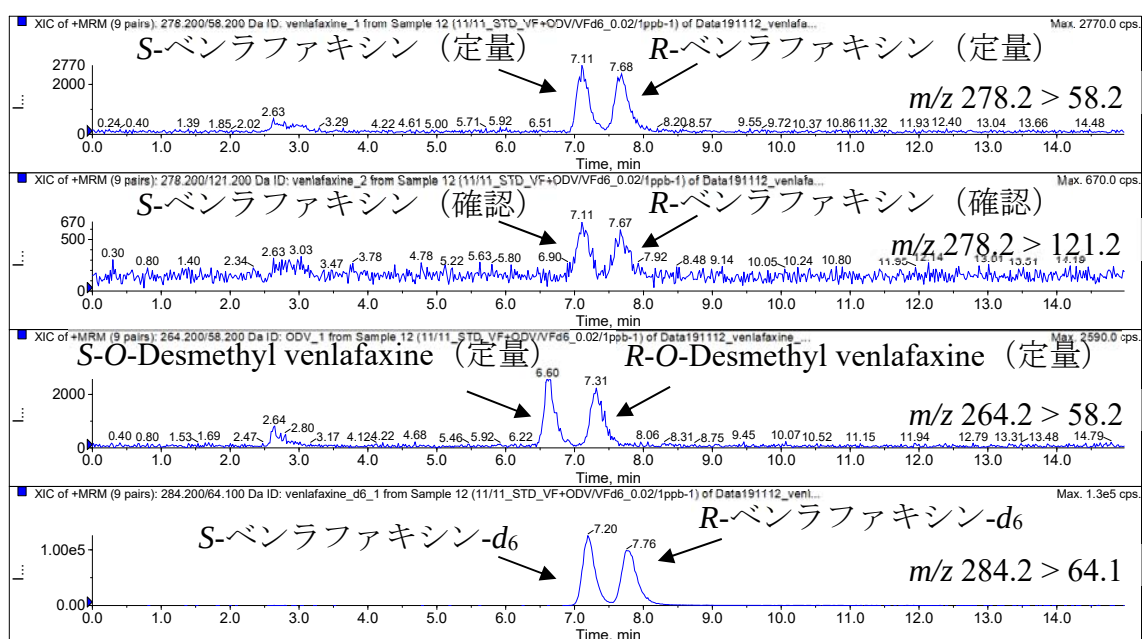


図 13 光学異性体毎の IDL 測定時の SRM クロマトグラム
 (S-、R-ベンラファキシン : 0.010 ng/mL、
 S-、R-O-desmethyl venlafaxine : 0.010 ng/mL、
 サロゲート内標準 S-、R-ベンラファキシン-d₆ : 0.50 ng/mL)

(注 8) *R*-, *S*-ベンラファキシン及び *R*-, *S*-*O*-desmethyl venlafaxine の MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)により、表 14-1、14-2 のとおり算出した。また図 14 に MDL 測定時のクロマトグラムを示した。

表 14-1 *S*-ベンラファキシン及び *S*-*O*-desmethyl venlafaxine の MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

対象物質名	<i>S</i> -ベンラファ キシ	回収率 (%) ^{*1}	サロゲート 回収率(%)	<i>S</i> - <i>O</i> - Desmethyl venlafaxine	回収率 (%) ^{*2}
試料	河川水	-	-	河川水	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	0.15	-	-	0.15	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.0015	-	-	0.0015	-
最終液量 (mL)	10	-	-	10	-
注入濃度 (µg/L)	0.015	-	-	0.015	-
装置注入量 (µL)	10	-	-	10	-
操作ブランク平均 (µg/L) ^{*3}	<0.00022	-	-	<0.00013	-
無添加平均 (µg/L) ^{*4}	<0.00022	-	-	0.00083	-
結果 1 (µg/L)	0.00127	84.2	94.2	0.00113	75.1
結果 2 (µg/L)	0.00127	84.7	100	0.00116	77.6
結果 3 (µg/L)	0.00142	94.2	96.8	0.00122	81.0
結果 4 (µg/L)	0.00127	84.3	98.6	0.00115	77.0
結果 5 (µg/L)	0.00134	88.9	96.2	0.00122	81.1
結果 6 (µg/L)	0.00127	84.3	94.5	0.00114	76.3
結果 7 (µg/L)	0.00128	84.9	98.2	0.00116	77.4
平均値 (µg/L)	0.001301	86.5	97.0	0.001169	77.9
標準偏差 (σ _{n-1}) (µg/L)	0.0000569			0.0000343	
MDL (µg/L) ^{*5}	0.00022			0.00013	
MQL (µg/L) ^{*6}	0.00057			0.00034	
S/N 比	22			26	
CV (%)	4.4			2.9	

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 定量結果は、絶対検量線での値である。

*3 : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*4 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*5 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*6 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

表 14-2 R-ベンラファキシン及び R-O-desmethyl venlafaxine の MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

対象物質名	R-ベンラファ キシン	回収率 (%)* ¹	サロゲート回 収率(%)	R-O- Desmethyl venlafaxine	回収率 (%)* ²
試料	河川水	-	-	河川水	-
試料量 (L)	0.10	-	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	0.15	-	-	0.15	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.0015	-	-	0.0015	-
最終液量 (mL)	10.0	-	-	10.0	-
注入濃度 (μg/L)	0.015	-	-	0.015	-
装置注入量 (μL)	10	-	-	10	-
操作ブランク平均 (μg/L)* ³	<0.00017	-	-	<0.00028	-
無添加平均 (μg/L)* ⁴	<0.00017	-	-	<0.00028	-
結果 1 (μg/L)	0.00124	82.2	93.6	0.00134	89.2
結果 2 (μg/L)	0.00127	84.3	97.5	0.00145	96.9
結果 3 (μg/L)	0.00127	84.2	102	0.00137	91.3
結果 4 (μg/L)	0.00134	89.1	96.6	0.00137	91.4
結果 5 (μg/L)	0.00124	82.5	97.5	0.00133	88.7
結果 6 (μg/L)	0.00122	80.8	91.4	0.00124	82.7
結果 7 (μg/L)	0.00131	87.2	94.5	0.00126	84.0
平均値 (μg/L)	0.001269	84.3	96.1	0.001338	89.2
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.0000439	-	-	0.0000719	-
MDL (μg/L)* ⁵	0.00017	-	-	0.00028	-
MQL (μg/L)* ⁶	0.00044	-	-	0.00072	-
S/N 比	31	-	-	38	-
CV(%)	3.5	-	-	5.4	-

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 定量結果は、絶対検量線での値である。

*3 : 空試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*4 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*5 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*6 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

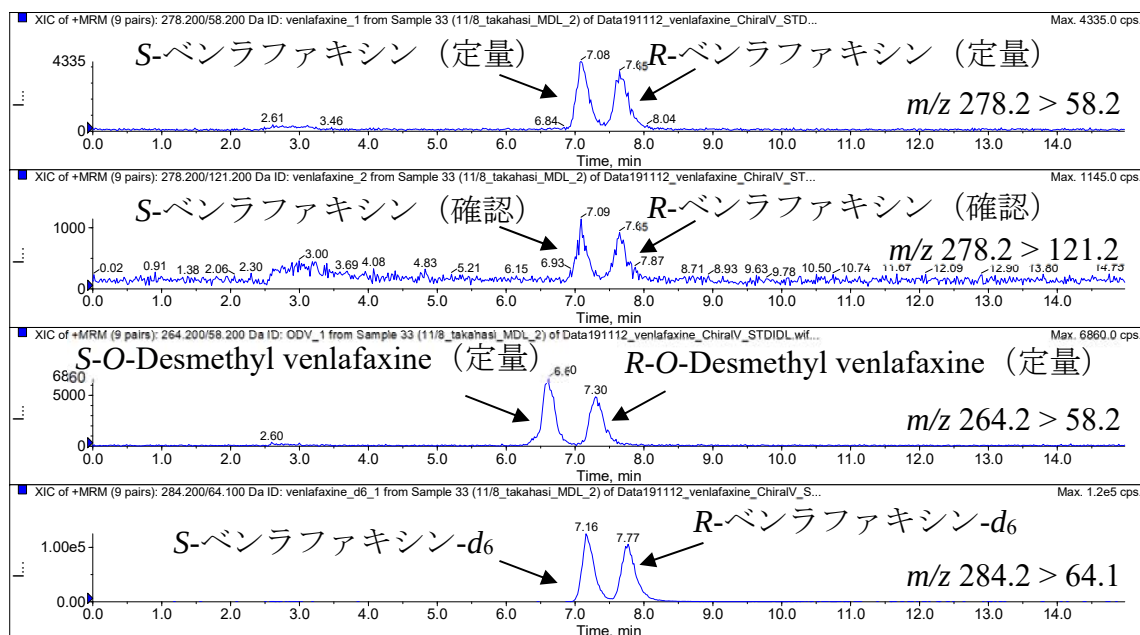


図 14 光学異性体毎の MDL 測定時のクロマトグラム
 (河川水 試料換算濃度 S-、R-ベンラファキシン : 0.0015 ng/mL、
 S-、R-O-desmethyl venlafaxine : 0.0015 ng/mL、
 サロゲート内標準 S-、R-ベンラファキシン-d₆ : 0.50 ng/mL)

〔光学異性体毎の検量線〕

検量線を図 15-1-1、15-1-2 及び図 15-2-1、15-2-2 に、検量線作成用データを表 15-1-1、15-1-2 及び表 15-2-1、15-2-2 に示す。

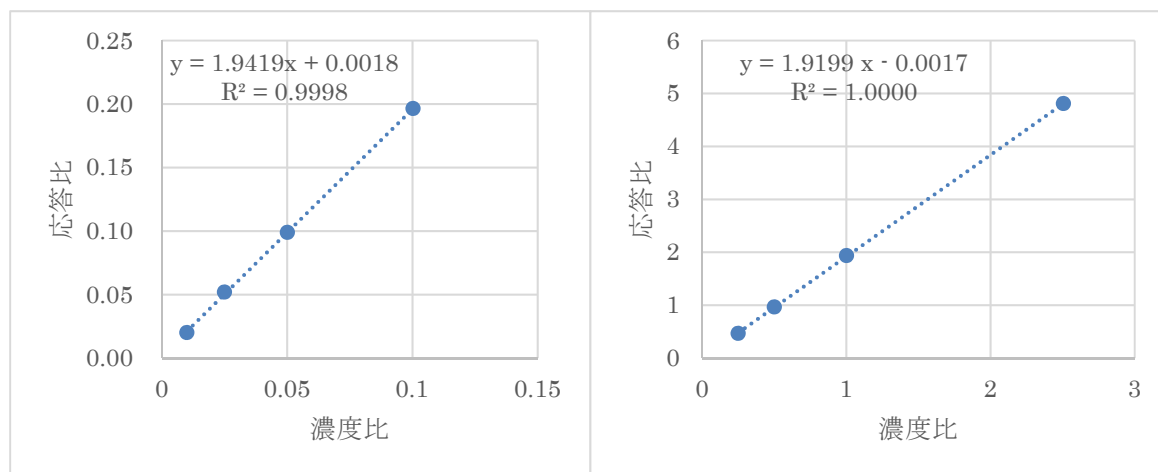


図 15-1-1 S-ベンラファキシンの検量線
(左図：低濃度検量線 0.010～0.10 ng/mL
右図：高濃度検量線 0.25～2.5 ng/mL)

表 15-1-1 検量線作成用データ (S-ベンラファキシシン)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis*1)	応答値		応答比 (As/Ais)
		対象物質(As)	内標準物質(Ais)	
		[S-ベンラファキシシン] (m/z 278 > 52)	[S-ベンラファキシシン-d ₆] (m/z 284 > 64)	
0.010	0.010	31864	1583745	0.0201
0.025	0.025	78307	1506948	0.0520
0.050	0.050	146106	1476910	0.0989
0.10	0.10	297502	1514861	0.196
0.25	0.25	721314	1541785	0.468
0.50	0.50	1504774	1557368	0.966
1.0	1.0	2989071	1544749	1.93
2.5	2.5	7253188	1508501	4.81

*1: Cis : 内標準物質濃度 (S 体) 0.50 ng/mL

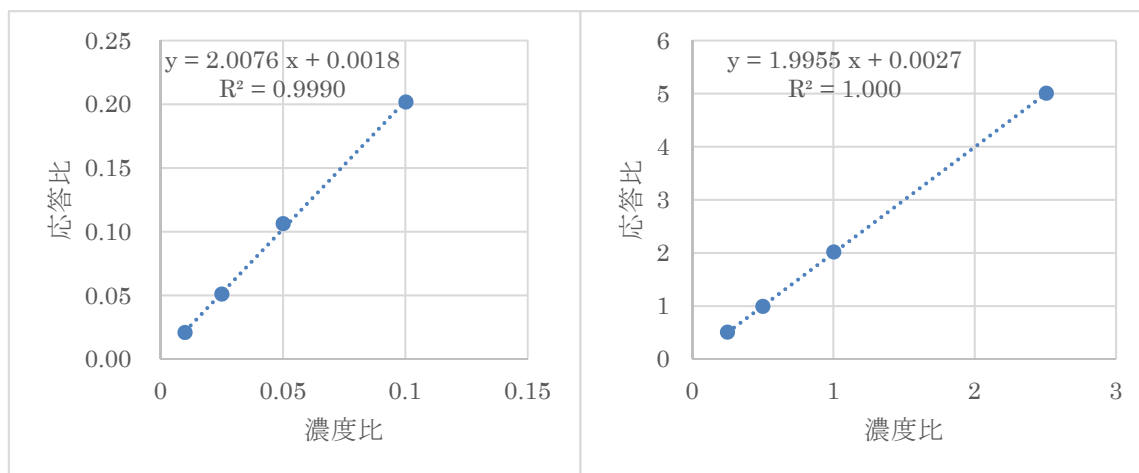


図 15-1-2 R-ベンラファキシンの検量線
(左図：低濃度検量線 0.010～0.10 ng/mL
右図：高濃度検量線 0.25～2.5 ng/mL)

表 15-1-2 検量線作成用データ (R-ベンラファキシシン)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	濃度比 (Cs/Cis*)	応答値		
		対象物質(As)	内標準物質(Ais)	応答比 (As/Ais)
		[R-ベンラファキシシン] (m/z 278 > 52)	[R-ベンラファキシシン-d ₆] (m/z 284 > 64)	
0.010	0.010	32794	1576394	0.0208
0.025	0.025	76381	1499933	0.0509
0.050	0.050	148872	1401518	0.106
0.10	0.10	297492	1475256	0.202
0.25	0.25	769559	1517250	0.507
0.50	0.50	1504738	1520175	0.990
1.0	1.0	2997149	1486683	2.02
2.5	2.5	7436354	1486097	5.00

*: Cis : 内標準物質濃度 (R 体) 0.50 ng/mL

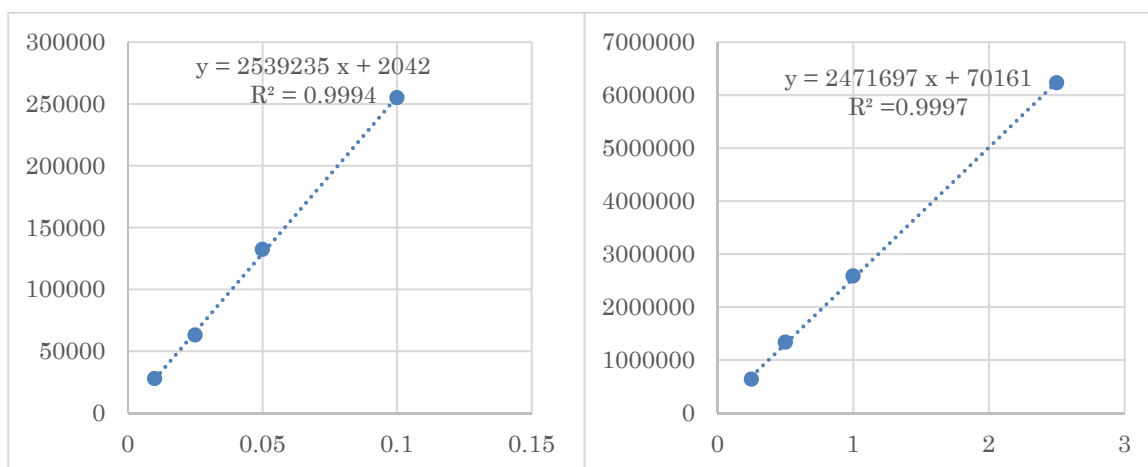


図 15-2-1 S-O-Desmethyl venlafaxine の検量線
 (左図：低濃度検量線 0.010～0.10 ng/mL
 右図：高濃度検量線 0.25～2.5 ng/mL)

表 15-2-1 検量線作成用データ (S-O-Desmethyl venlafaxine)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値
	対象物質(As)
	[S-O-Desmethyl venlafaxine] (m/z 264 > 58)
0.010	27768
0.025	62984
0.050	132211
0.10	254963
0.25	636476
0.50	1332285
1.0	2584239
2.5	6232358

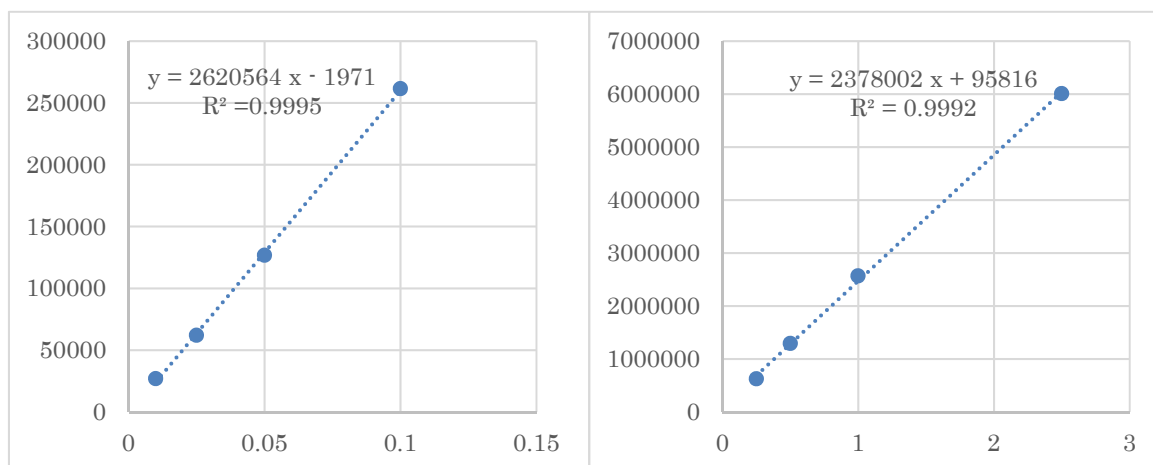


図 15-2-2 *R-O-Desmethyl venlafaxine* の検量線
 (左図：低濃度検量線 0.010～0.10 ng/mL
 右図：高濃度検量線 0.25～2.5 ng/mL)

表 15-2-2 検量線作成用データ (*R-O-Desmethyl venlafaxine*)

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値
	対象物質(As)
	[<i>R-O-Desmethyl venlafaxine</i>] (m/z 264 > 58)
0.010	26890
0.025	61974
0.050	126633
0.10	261425
0.25	622539
0.50	1290739
1.0	2567588
2.5	6008906

[S 体、R 体の標準液のクロマトグラム]

標準液の SRM クロマトグラムを図 16 に示す。

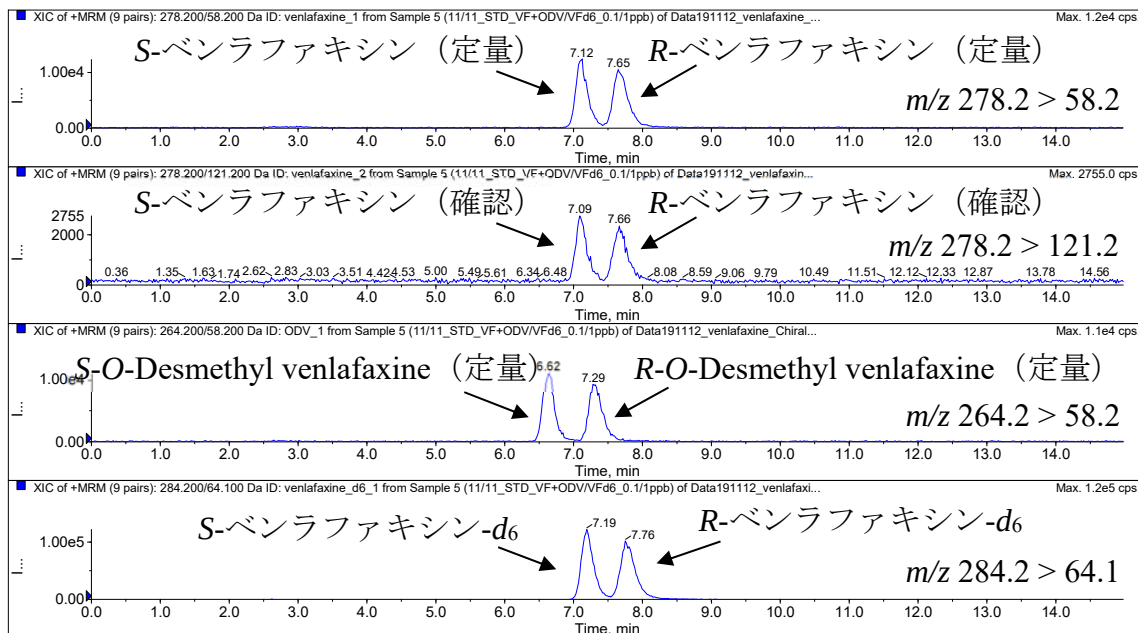


図 16 標準液の SRM クロマトグラム

(S-、R-ベンラファキシン : 0.10 ng/mL、

S-、R-O-desmethyl venlafaxine : 0.10 ng/mL、

サロゲート内標準 S-、R-ベンラファキシン- d_6 : 0.50 ng/mL)

〔S 体、R 体の添加回収試験〕

河川水の添加回収試験を S 体、R 体に分離して行った結果を表 16 にクロマトグラムを図 17-1、17-2、図 18-1、18-2 に示す。

表 16 添加回収試験の結果

試料名	物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	試験 数	検出 濃度 (ng/mL)*	回収率 (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
河川水	S-ベンラファキシン	0.10	0	2	<0.00022	-		86
		0.10	0.50	5	0.0055	108	4.0	90
	S-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	0	2	0.0039	-		-
		0.10	0.50	5	0.0089	100	2.2	-
	R-ベンラファキシン	0.10	0	2	<0.00017	-		87
		0.10	0.50	5	0.0055	110	4.7	87
	R-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	0	2	0.00098	-		-
		0.10	0.50	5	0.0057	94	1.4	-
海水	S-ベンラファキシン	0.10	0	2	0.0016	-		99
		0.10	0.50	5	0.0070	108	4.1	98
	S-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	0	2	0.0097	-		-
		0.10	0.50	5	0.015	106	3.9	-
	R-ベンラファキシン	0.10	0	2	0.00087	-		96
		0.10	0.50	5	0.0056	94	2.6	91
	R-O-Desmethyl venlafaxine	0.10	0	2	0.0011	-		-
		0.10	0.50	5	0.0066	110	5.2	-

* : S-、R-ベンラファキシンの検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値、
S-、R-O-desmethyl venlafaxine は絶対検量線法による値

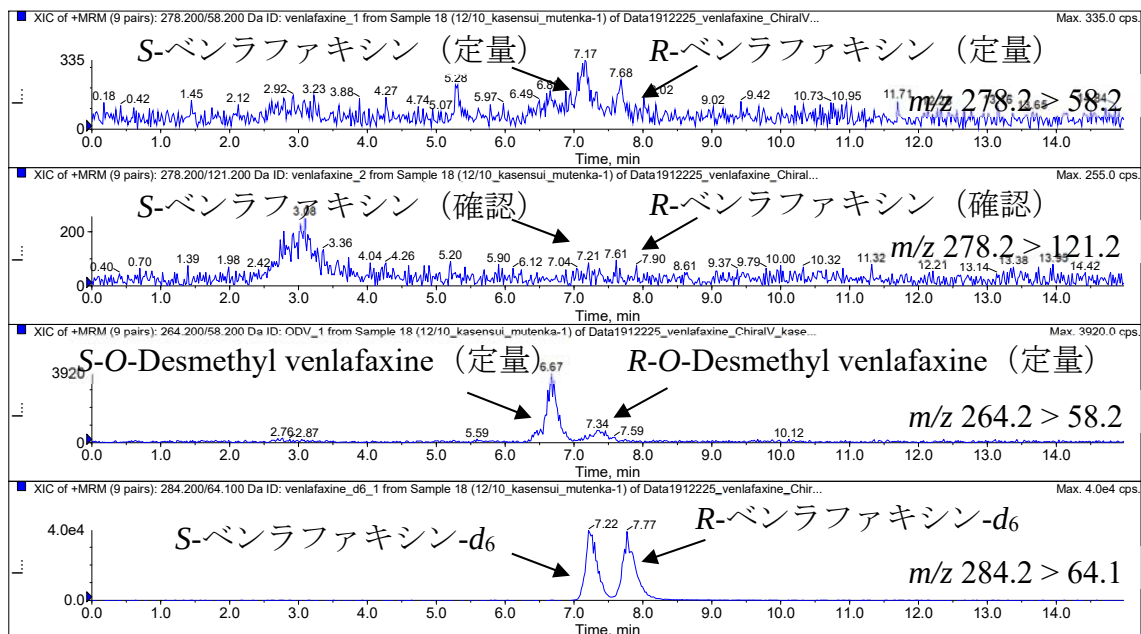


図 17-1 添加回収のクロマトグラム (河川水、無添加)

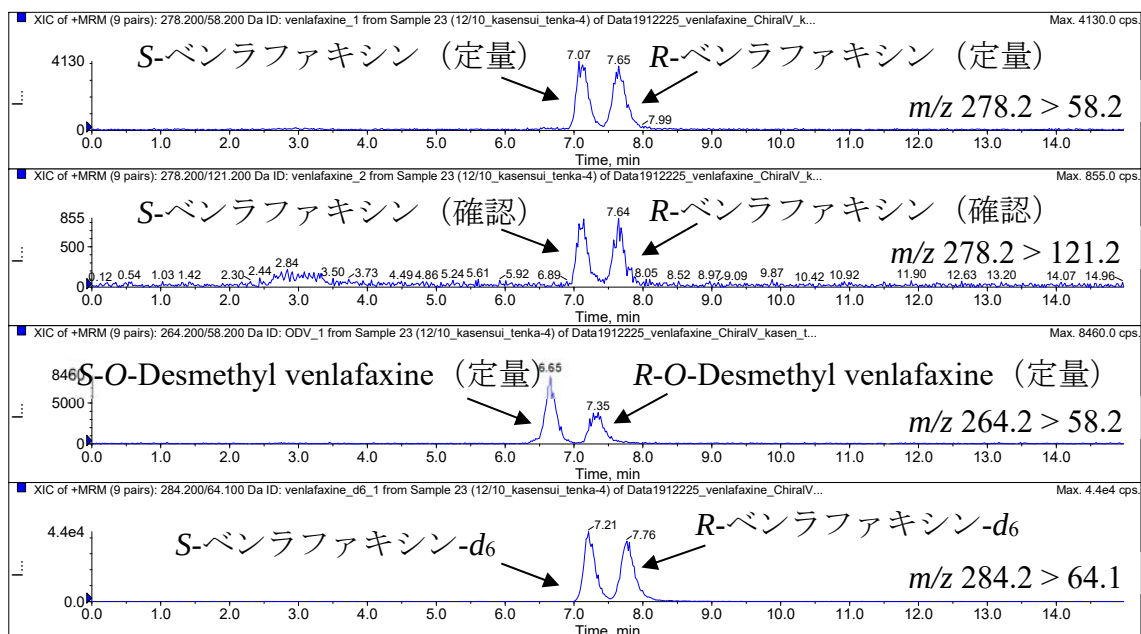


図 17-2 添加回収のクロマトグラム (河川水、添加濃度 0.0050 ng/mL)

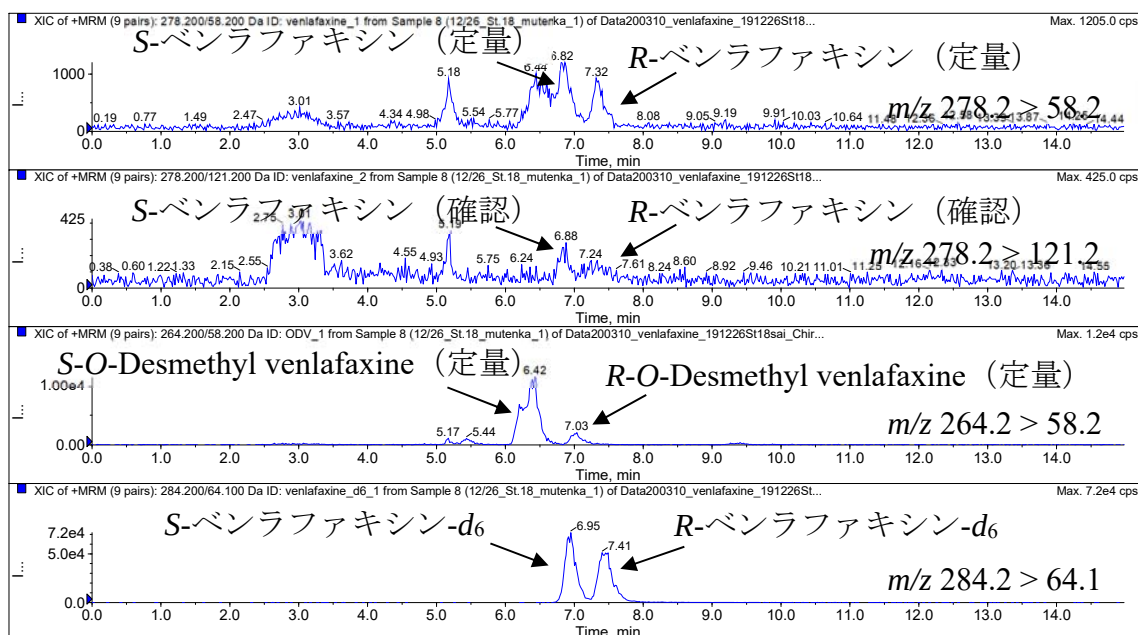


図 18-1 添加回収のクロマトグラム（海水、無添加）

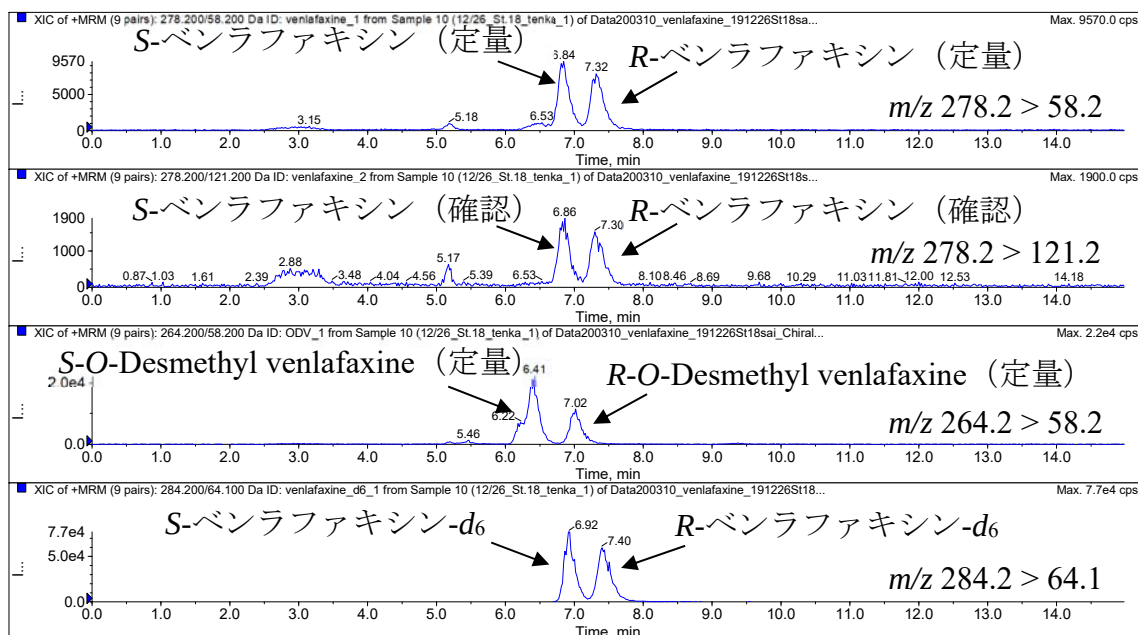


図 18-2 添加回収のクロマトグラム（海水、添加濃度 0.0050 ng/mL）

〔S 体、R 体の分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 17 に示す。

表 17 分解性スクリーニング結果

物質名	pH ^{*2}	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*1)		
				1 時間放置後	7 日間放置後	
					暗所	明所
S-ベンラフ ァキシン	5	2	0.0050	0.00506(101)	0.00513(102)	-
	7	2	0.0050	0.00508(101)	0.00587(117)	0.00559(111)
	9	2	0.0050	0.00502(100)	0.00533(106)	-
S-O- Desmethyl venlafaxine	5	2	0.0050	0.00598(120)	0.00526(105)	-
	7	2	0.0050	0.00576(115)	0.00587(117)	0.00579(116)
	9	2	0.0050	0.00513(103)	0.00548(110)	-
R-ベンラフ ァキシン	5	2	0.0050	0.00460(92)	0.00498(99)	-
	7	2	0.0050	0.00506(101)	0.00544(108)	0.00535(107)
	9	2	0.0050	0.00446(89)	0.00586(117)	-
R-O- Desmethyl venlafaxine	5	2	0.0050	0.00533(107)	0.00502(100)	-
	7	2	0.0050	0.00497(99)	0.00591(118)	0.00533(107)
	9	2	0.0050	0.00451(90)	0.00500(100)	-

*1：残存率(%):調製濃度に対する検出濃度の割合（S-、R-ベンラファキシン：サロゲート補正後の値、S-、R-O-desmethyl venlafaxine：絶対検量線法による値）

*2：5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液を精製水で作成し、その後 1%ギ酸及び 1%アンモニア水で pH5、7、9 に調製した。

〔S 体、R 体の保存性試験〕

〔水質試料の保存性〕

保存性試験結果を表 18-1 及び表 18-2 に示す。S-、R-ベンラファキシンについて試料の保存性試験はサロゲート補正を行い、粗抽出液及び標準液の保存性試験は絶対検量線法とした。また S-、R-O-desmethyl venlafaxine は全て絶対検量線法で求めた。

表 18-1 保存安定性試験結果 (S-、R-ベンラファキシン)

物質名		試料名	調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)（残存率(%)*）			
				1 時間	7 日間	14 日間	1 ヶ月
S-ベンラ ファキン	河 川 水	試料	0.0050	0.00544 (108)	0.00463 (92)	-	-
		粗抽出液	0.0050	-	-	0.00462 (92)	-
	海 水	試料	0.010	0.00928 (93)	0.0103 (103)	-	-
		粗抽出液	0.10	-	-	0.00830 (83)	-
	標 準 液	検量線 最低濃度	0.010	-	-	-	0.0105 (105)
		検量線 最高濃度	2.5	-	-	-	2.43 (97)
R-ベンラ ファキシ ン	河 川 水	試料	0.0050	0.00546 (109)	0.00481 (96)	-	-
		粗抽出液	0.0050	-	-	0.00486 (97)	-
	海 水	試料	0.010	0.0102 (102)	0.0105 (105)	-	-
		粗抽出液	0.10	-	-	0.00885 (88)	-
	標 準 液	検量線 最低濃度	0.010	-	-	-	0.0115 (115)
		検量線 最高濃度	2.5	-	-	-	2.60 (104)

*：調製濃度に対する検出濃度の割合

表 18-2 保存安定性試験結果 (S-、R-O-Desmethyl venlafaxine)

物質名	試料名		調製 濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%))*			
				1 時間	7 日間	14 日間	1 ヶ月
S-O- Desmethyl venlafaxine	河川 水	試料	0.0050	0.00502 (100)	0.00391 (78)	-	-
		粗抽出液	0.0050	-	-	0.00553 (111)	-
	海水	試料	0.010	0.0107 (107)	0.00977 (98)	-	-
		粗抽出液	0.010	-	-	0.00761 (76)	-
	標準 液	検量線 最低濃度	0.010	-	-	-	0.00872 (87)
		検量線 最高濃度	2.5	-	-	-	2.58 (103)
	河川 水	試料	0.0050	0.00471 (94)	0.00596 (119)	-	-
		粗抽出液	0.0050	-	-	0.00489 (98)	-
R-O- Desmethyl venlafaxine	海水	試料	0.010	0.00955 (96)	0.0108 (108)	-	-
		粗抽出液	0.010	-	-	0.00918 (92)	-
	標準 液	検量線 最低濃度	0.010	-	-	-	0.0100 (100)
		検量線 最高濃度	2.5	-	-	-	2.59 (104)

* : 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔S 体、R 体の環境試料の分析〕

本法を用いて大阪府内の環境試料を測定した結果、河川水（寝屋川）では S-、R-ベンラファキシンは 0.018 $\mu\text{g/L}$ （S 体）、0.012 $\mu\text{g/L}$ （R 体）、S-、R-O-desmethyl venlafaxine は 0.27 $\mu\text{g/L}$ （S 体）、0.031 $\mu\text{g/L}$ （R 体）が検出された（図 19）。海水（大阪湾）では S-、R-ベンラファキシンは 0.0016 $\mu\text{g/L}$ （S 体）、0.00087 $\mu\text{g/L}$ （R 体）、S-、R-O-desmethyl venlafaxine は 0.0097 $\mu\text{g/L}$ （S 体）、0.0011 $\mu\text{g/L}$ （R 体）が検出された（前述の図 18-1）。

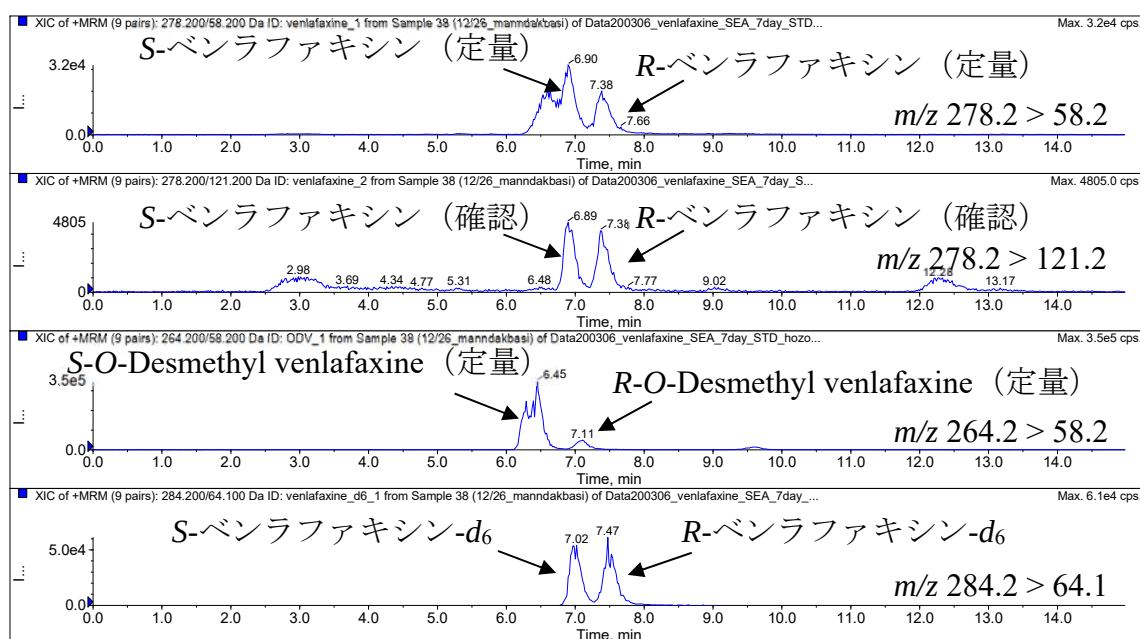


図 19 河川水のクロマトグラム（寝屋川）

【評価】

環境水中に含まれる、ベンラファキシン及びその代謝物 O-desmethyl venlafaxine の同時分析法を開発した。本法のベンラファキシンの MDL は 0.00024 ng/mL であった。検量線は 0.0050 ～ 5.0 ng/mL の濃度範囲で直線性 ($r^2 > 0.9999$) が確認された。水質試料 100 mL に対象物質を添加した際の回収率は、河川水で 106%（サロゲート回収率 85%、変動係数 2.9%）、海水で 100%（サロゲート回収率 88%、変動係数 4.3%）であった。本法により、大阪府内の河川水及び海水でのベンラファキシンを測定したところ、それぞれ 0.028 ng/mL 及び 0.0014 ng/mL 検出された。同様に O-desmethyl venlafaxine の MDL は 0.00033 ng/mL であり、検量線は 0.0050 ～ 5.0 ng/mL の濃度範囲で直線性 ($r^2 > 0.9995$) が確認された。回

収率は河川水で 94% (変動係数 1.6%)、海水で 88% (変動係数 1.3%) であり、環境中濃度は河川水で 0.052 ng/mL、海水で 0.0020 ng/mL が検出された。

本法は環境水中に含まれるベンラファキシンを 0.2 ng/L レベルで検出することが可能である。

また本法の試験液を用いて、分析カラム及び LC 条件を変えることによりベンラファキシン及び *O*-desmethyl venlafaxine の光学異性体 (*R*-、*S*-体) の分離分析が可能であった。

【担当者連絡先】

所属先名称 : 地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所

所属先住所 : 〒583-0862 大阪府羽曳野市尺度 442

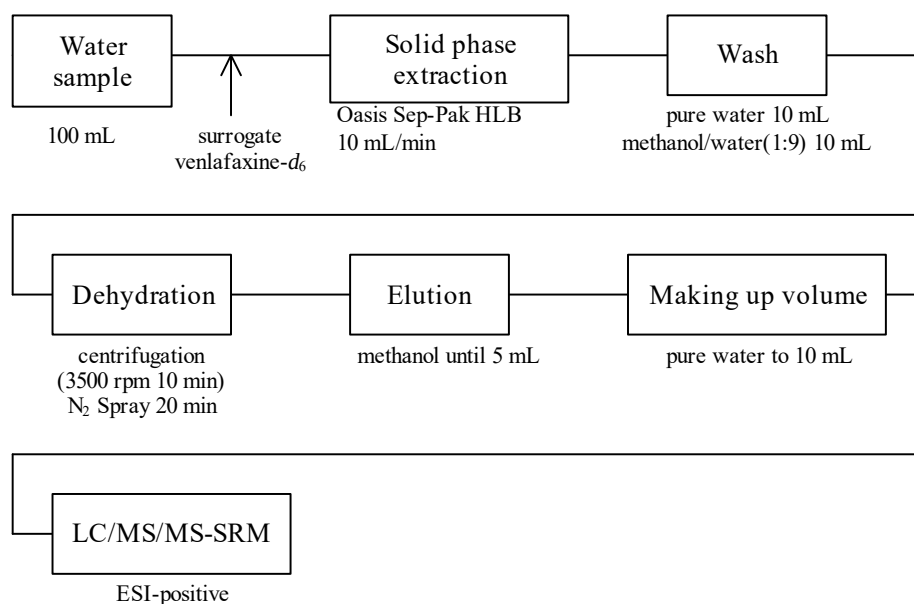
TEL : 072-979-7064 FAX : 072-956-9790

担当者名 : 小野 純子

E-mail : OnoJ@mbox.kannousuiken-osaka.or.jp

Venlafaxine

This method provides procedures for the determination of venlafaxine and *O*-desmethyl venlafaxine in river and sea water samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Venlafaxine-*d*₆ (10 ng) is added to 100 mL of water sample as a surrogate (internal standard), and then the analytes are extracted from the water sample by passing through a solid phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus). After the extraction, the cartridge is washed with 10 mL of purified water and 10 mL of water/methanol (90:10). Then the residual water in the cartridge is removed by centrifugation (3500 rpm, 10 min) and nitrogen gas purge (20 min). The analytes are eluted from the cartridge with 5 mL of methanol and the eluate is made up to 10 mL by addition of purified water. A 10 uL aliquate of the final solution is injected for LC/MS/MS-SRM (ESI-positive) analysis. The method detection limit (MDL) of venlafaxine is 0.00024 ng/mL. The recoveries of venlafaxine from river water and sea water samples were 106% and 100% with relative standard deviations of 2.9% and 4.3%, respectively. Using the method, concentrations of venlafaxine detected were 0.027 ng/mL in the Neyagawa River and 0.0014 ng/mL in the Osaka Bay, respectively.



物質名	分析法フローチャート	備 考
ベンラファキシン	【水質】 <pre> graph TD A[水質試料 100 mL] --> C[固相抽出 Oasis Sep-Pak HLB 10 mL/min] B[サロゲート内標準 ベンラファキシン-d6] --> C C --> D[洗浄 精製水 10 mL メタノール/精製水(1:9) 10 mL] D --> E[脱水 遠心分離 (3500 rpm 10 分) N2 通気 20 min] E --> F[溶出 メタノール 5 mL] F --> G[定容 精製水で 10 mLに] G --> H[LC/MS/MS-SRM ESI-positive] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive 検出下限値： 【水質】(μg/L) 0.00024 分析条件： 機器 LC： SHIMADZU LC-20 Series MS：Sciex QTRAP 4500 カラム Waters XBridge C18 100 mm×2.1 mm, 3.5 μm

O-Desmethyl venlafaxine（確認）のクロマトグラフの追加

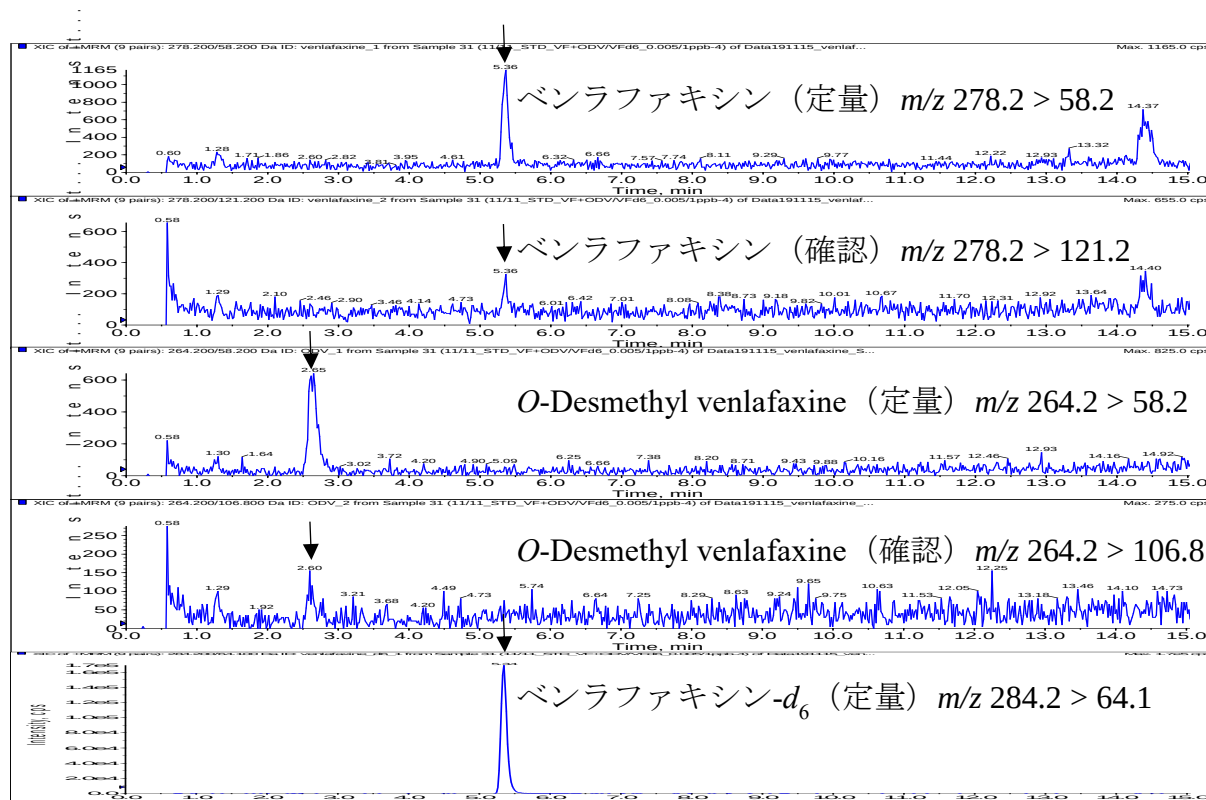


図1 IDL測定時のSRMクロマトグラム（ベンラファキシン：0.0050 ng/mL、O-Desmethyl Venlafaxine：0.0050 ng/mL、内標準ベンラファキシン- d_6 ：1.0 ng/mL）

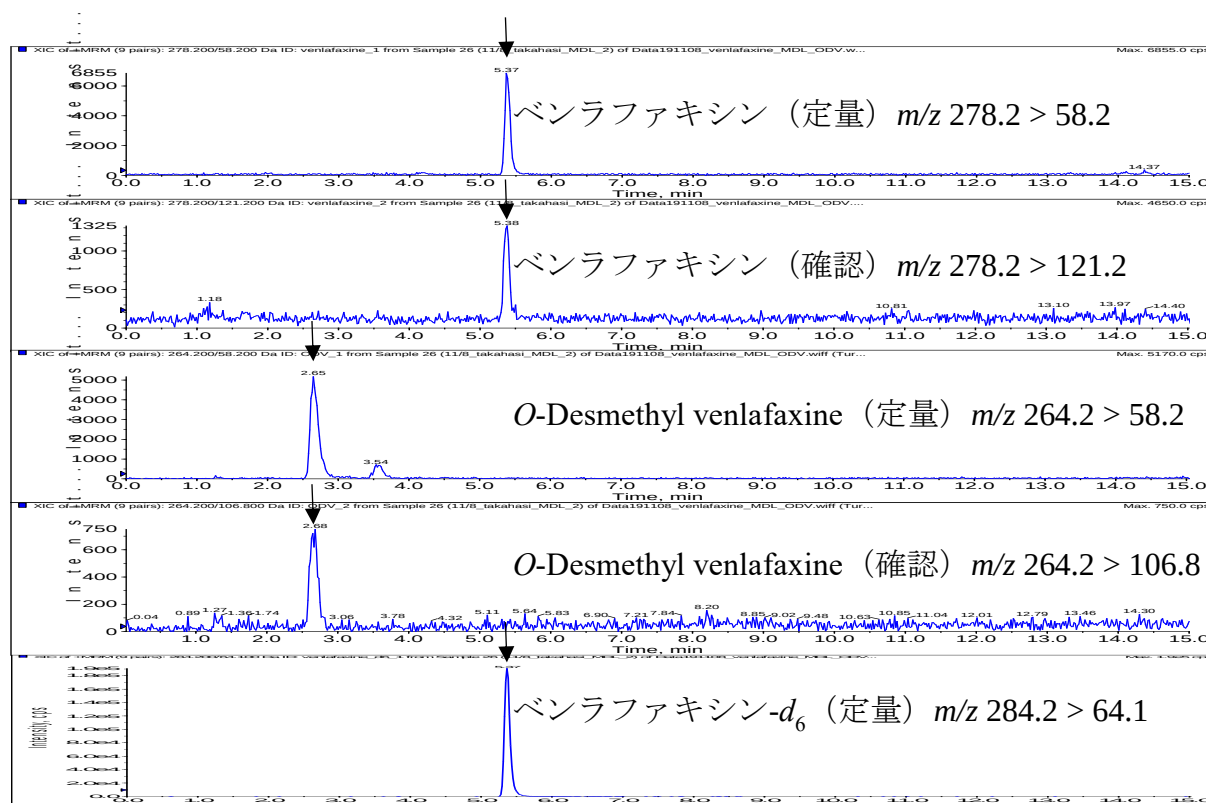


図2 MDL測定時のクロマトグラム（河川水：試料換算濃度 ベンラファキシン：0.030 $\mu\text{g/L}$ 、O-Desmethyl Venlafaxine：0.030 $\mu\text{g/L}$ ）

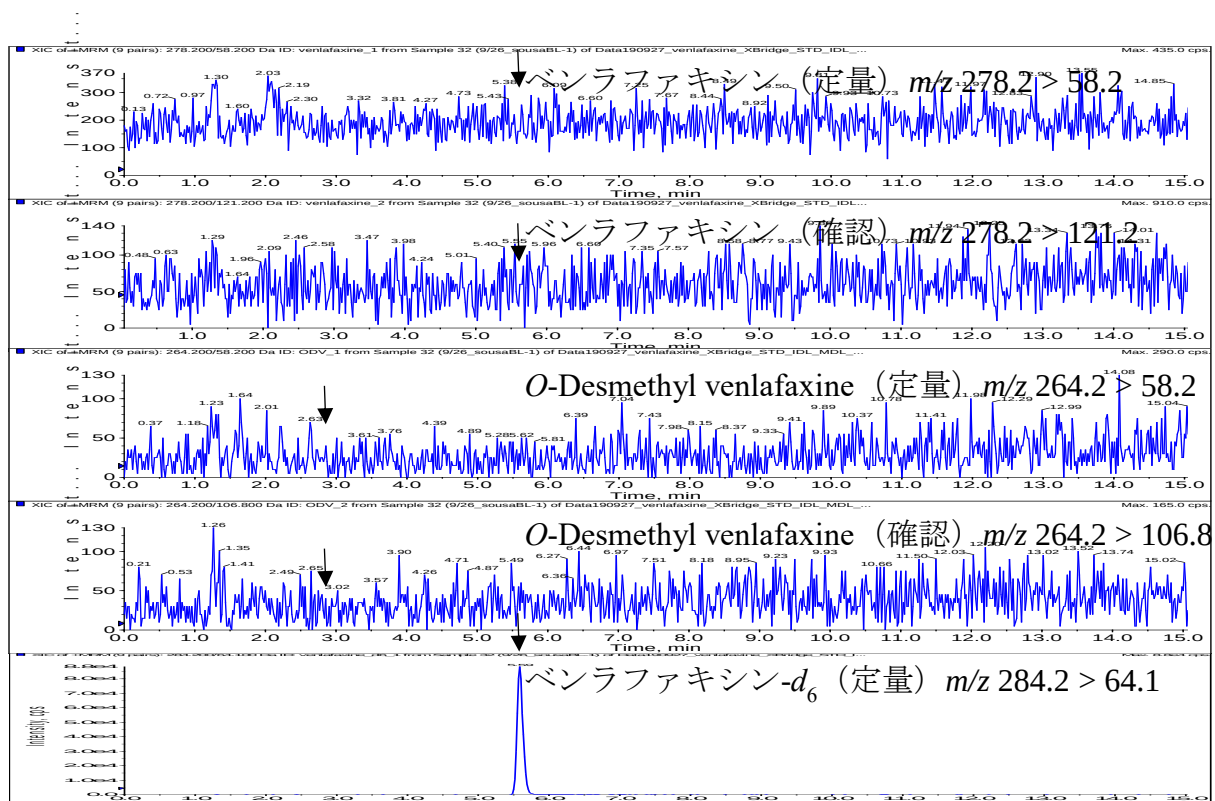


図7 操作ブランク（ベンラファキシン-d₆ : 1.0 ng/mL）のクロマトグラム

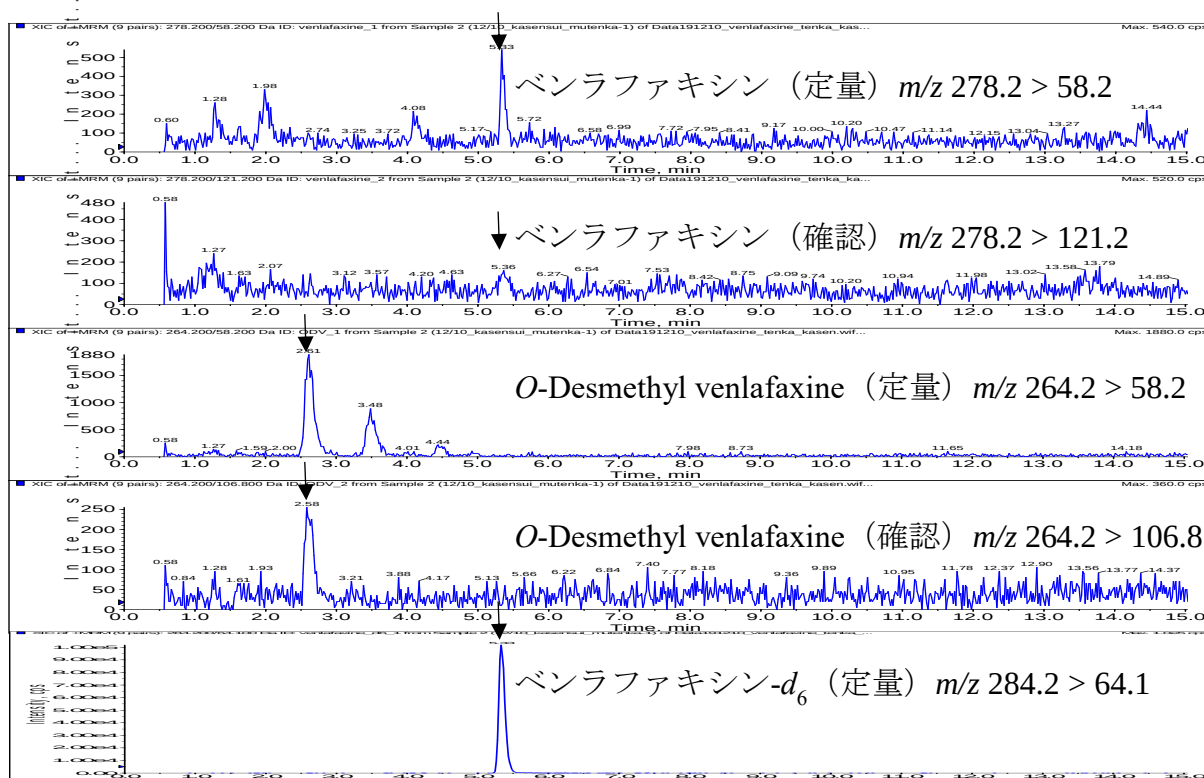


図 8-1 添加回収のクロマトグラム (河川水：無添加)

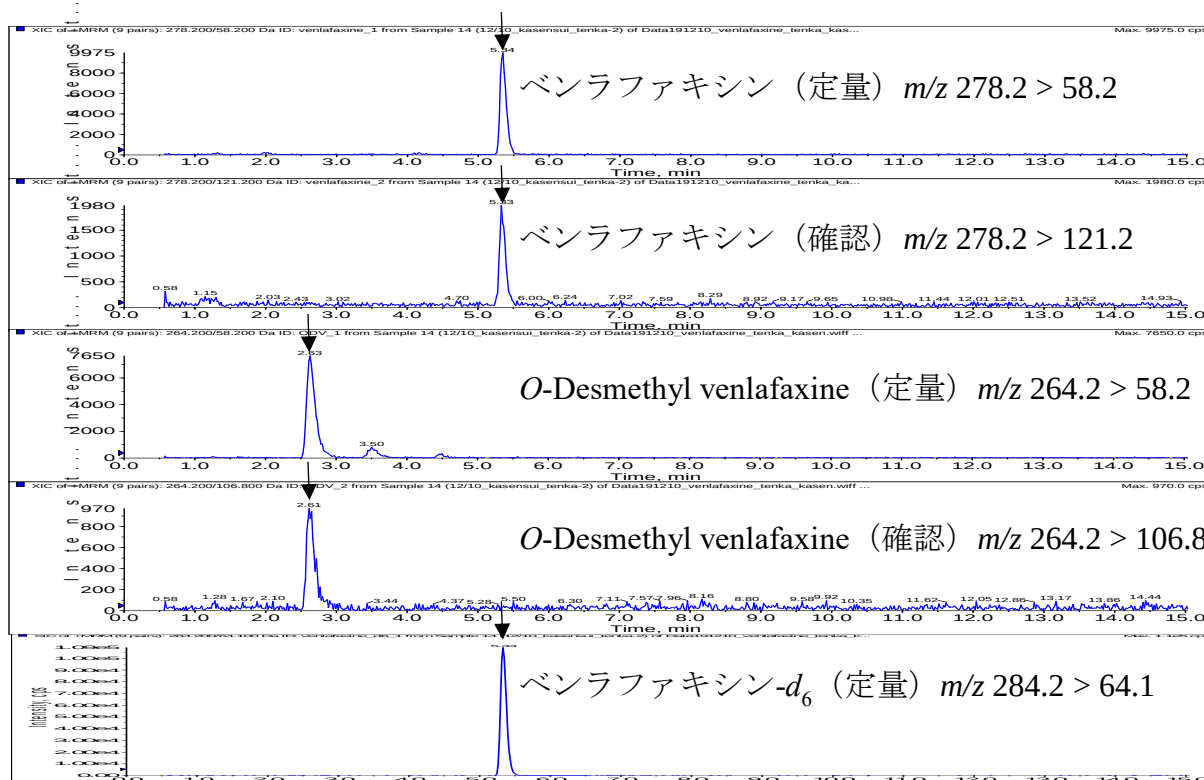


図 8-2 添加回収のクロマトグラム (河川水：添加)

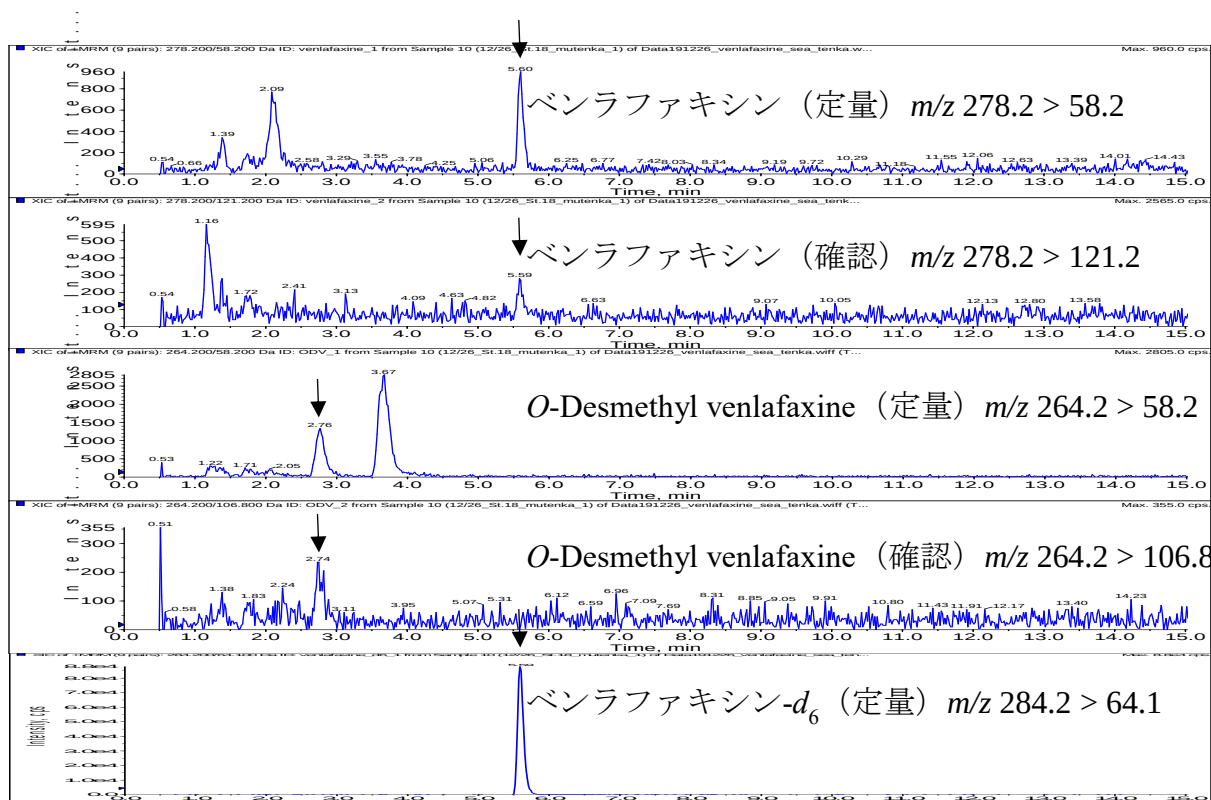


図 9-1 添加回収のクロマトグラム (海水：無添加)

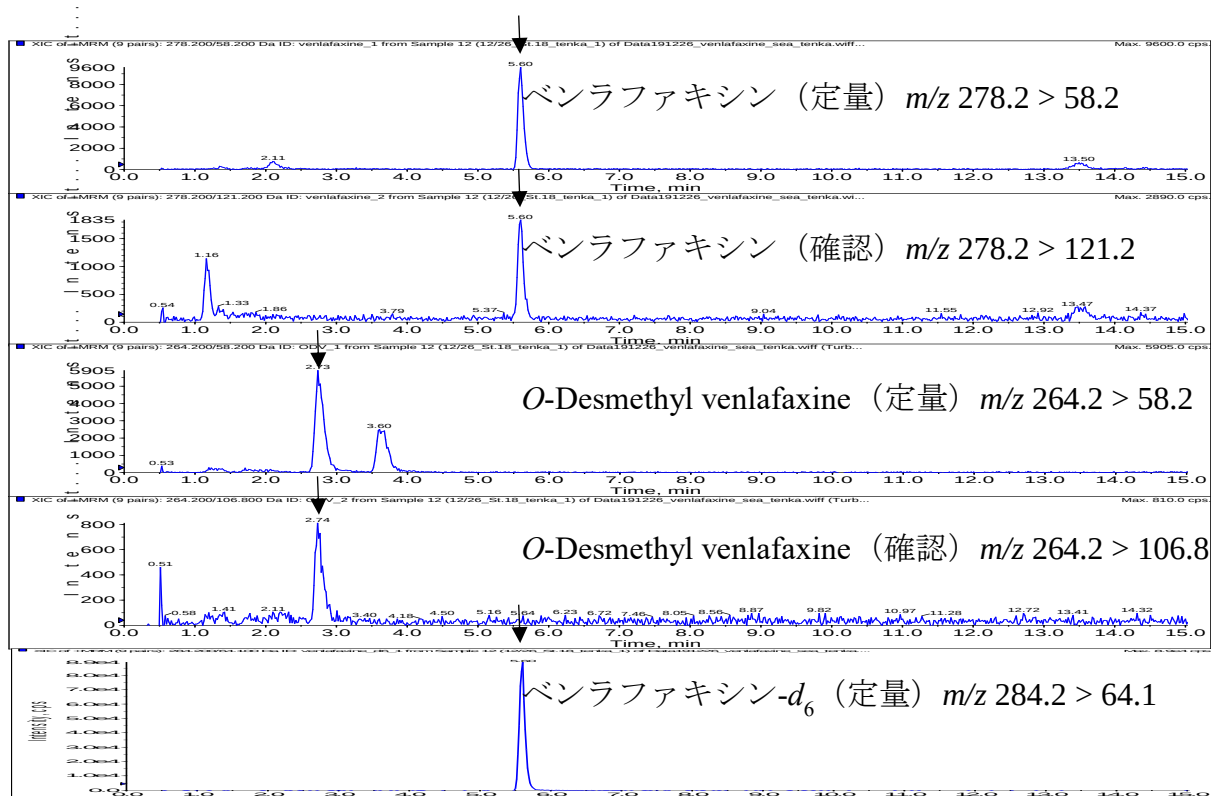


図 9-2 添加回収のクロマトグラム (海水：添加)

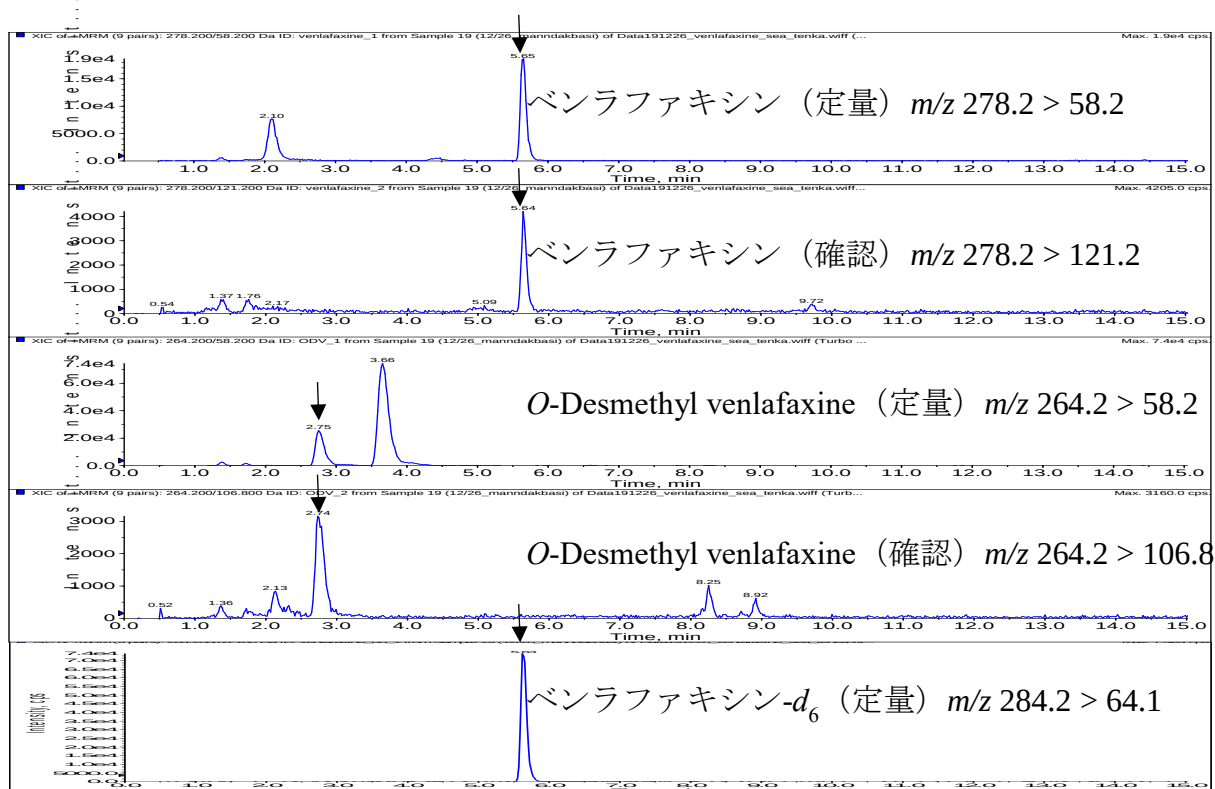
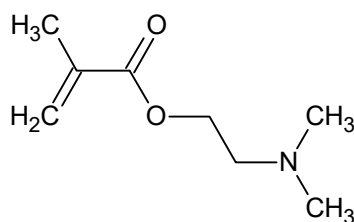


図 10 河川水（寝屋川）のクロマトグラム

メタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル

2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate

【対象物質の構造】



2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate

(MDAE)

CAS 番号：2867-47-2

分子式：C₈H₁₅NO₂

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モライトビツク質量)	融点 (°C)	沸点 (°C)	比重	蒸気圧 (Pa)	水溶解度 (g/L)	log Pow
MDAE	157.21 (157.1103)	-30 ¹⁾	182-190 ¹⁾	0.933 (20°C) ¹⁾	100 (20°C) ¹⁾	500 (20°C) (計算値) ²⁾	0.97 (推定値) ³⁾

【毒性、用途】

【実験動物に対する急性毒性情報】

マウス（腹腔内）LD₅₀：25-97.2 mg/kg、ラット（経口）LD₅₀：>2000-2659 mg/kg、
ラット（吸入）LC₅₀：1.85 mg/m³（1 時間）、ラット（経皮）LD₅₀：>2000 mg/kg ¹⁾

【用途】

樹脂（塗料、接着剤、イオン交換樹脂）の合成原料、繊維処理剤、潤滑油添加剤の合成原料、ゴム配合剤（強度向上安定剤）、紙加工剤、高分子凝集剤 ⁴⁾

出典

1) 財団法人化学物質評価研究機構：CERI 有害性評価書「メタクリル酸 2-(ジメチルアミ

- ノ)エチル」
- 2) EU, European Union (2000) IUCLID, International Uniform Chemical Information Database, ver. 3.1.1.
 - 3) SRC, Syracuse Research Corporation (2005) KowWin Estimation Software, ver.1.66, North Syracuse, NY.
 - 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム(CHRIP)

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料を固相抽出カートリッジに通水後、アセトニトリルで溶出し、LC/MS/MS-SRM(ESI+)法で分析する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

メタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル (MDAE)	: 富士フイルム和光純薬製 和光特級 (純度 > 99%)
アセトニトリル	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
精製水	: 富士フイルム和光純薬製 超純水 LC/MS 用
10%塩酸	: 富士フイルム和光純薬製
1 mol/L ギ酸アンモニウム	: 富士フイルム和光純薬製 高速液体クロマトグラフ用
固相カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak AC-2

【試薬の調製】

〔標準原液〕

MDAE を正確に 20.0 mg 量り取り、アセトニトリルで 20 mL として 1000 µg/mL の標準原液を調製する。

〔検量線用標準液〕

標準原液をアセトニトリルで順次希釈し、検量線用標準液を調製する。検量線用標準液の各濃度は、0.025 ng/mL～20 ng/mL とする。

【器具】

メスフラスコ(10～50 mL)、ホールピペット(1～5 mL)、駒込ピペット(2～10 mL)、ガラス製注射筒(10 mL)、固相抽出装置 (注 1)

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って採取する。

容量 500 mL～1 L 程度の密栓できるポリエチレンまたはポリプロピレン製容器に水質試料を採取し、10%塩酸を試料 100 mL につき 1 mL 添加する(注 2)。採取後は速やかに試験操作を行う。速やかに行えない場合は、冷暗所に遮光して保存する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 100 mL を、あらかじめアセトニトリル及び 0.1%塩酸各 10 mL でコンディショニングした固相カートリッジに 10 mL/min で通水する。通水後、0.1%塩酸 10 mL で洗浄し、遠心分離(3000rpm, 5 min)により脱水する。アセトニトリル約 20 mL でバックフラッシュ法により溶出し、アセトニトリルで 20 mL に定容して試験液とする。

【空試験液の調製】

精製水 100 mL に 10%塩酸 1 mL を添加し、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

【LC/MS 測定条件】

[LC 条件]

使用機種	: Waters 製 AQUITY
カラム	: Sigma-Aldrich 製 Discovery HS F5 (2.1 mm×100 mm, 5 µm)
移動相	: A 10 mmol/L ギ酸アンモニウム、B アセトニトリル 0 → 15 min A:B = 10:90
カラム流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 2 µL

[MS 条件]

使用機種	: Waters 製 Xevo TQ MS
キャピラリー電圧	: 3.5 kV
イオン源温度	: 150°C

脱溶媒温度 : 400°C
 コーンガス流量 : 50 L/Hr
 脱溶媒ガス流量 : 800 L/Hr
 イオン化法 : ESI-Positive
 モニターイオン : m/z 158.1 > 113.1 (定量)、158.1 > 72.1 (確認)
 コーン電圧 : 14 V (定量)、14 V (確認)
 コリジョン電圧 : 12 V (定量)、12 V (確認)

[検量線]

検量線用標準液 2 μ L を LC/MS/MS に注入し、対象物質の濃度と得られたピーク面積から検量線を作成する。

[定量]

試験液 2 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたピーク面積を検量線に照らして定量する。

[濃度の算出]

試料中の濃度 (ng/L) は次式により算出する。

水質試料中の濃度 (μ g/L) = 検出濃度 (ng/mL) $\times$ 最終液量 (mL) / 試料量 (L) / 1000

[装置検出下限値(IDL)]

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す (注 3)。

表 1 IDL 算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μ g/L)
MDAE	0.012	0.10	20	0.0012

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 4)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
MDAE	0.10	20	0.0015	0.0039

注 解

- (注 1) ガラス製体積計は、JIS R 3505 に記載のクラス A のものを使用する。
- (注 2) MDAE は水中で中性～アルカリ性条件下では加水分解が起きるため、採水後速やかに塩酸を添加して酸性とする。
- (注 3) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って表 3 のとおりに算出した。また、図 1 に IDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

対象物質名	MDAE
試料量 (L)	0.10
最終液量 (mL)	20
注入液濃度 (ng/mL)	0.025
注入量 (pg)	0.050
装置注入液量 (μL)	2.0
結果 1 (pg)	0.0548
結果 2 (pg)	0.0595
結果 3 (pg)	0.0567
結果 4 (pg)	0.0583
結果 5 (pg)	0.0519
結果 6 (pg)	0.0527
結果 7 (pg)	0.0520
平均値 (pg)	0.05564
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.00306
IDL (pg)*	0.012
IDL 試料換算値 ($\mu\text{g/L}$)	0.0012
S/N 比	15
CV (%)	5.5

*: $\text{IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

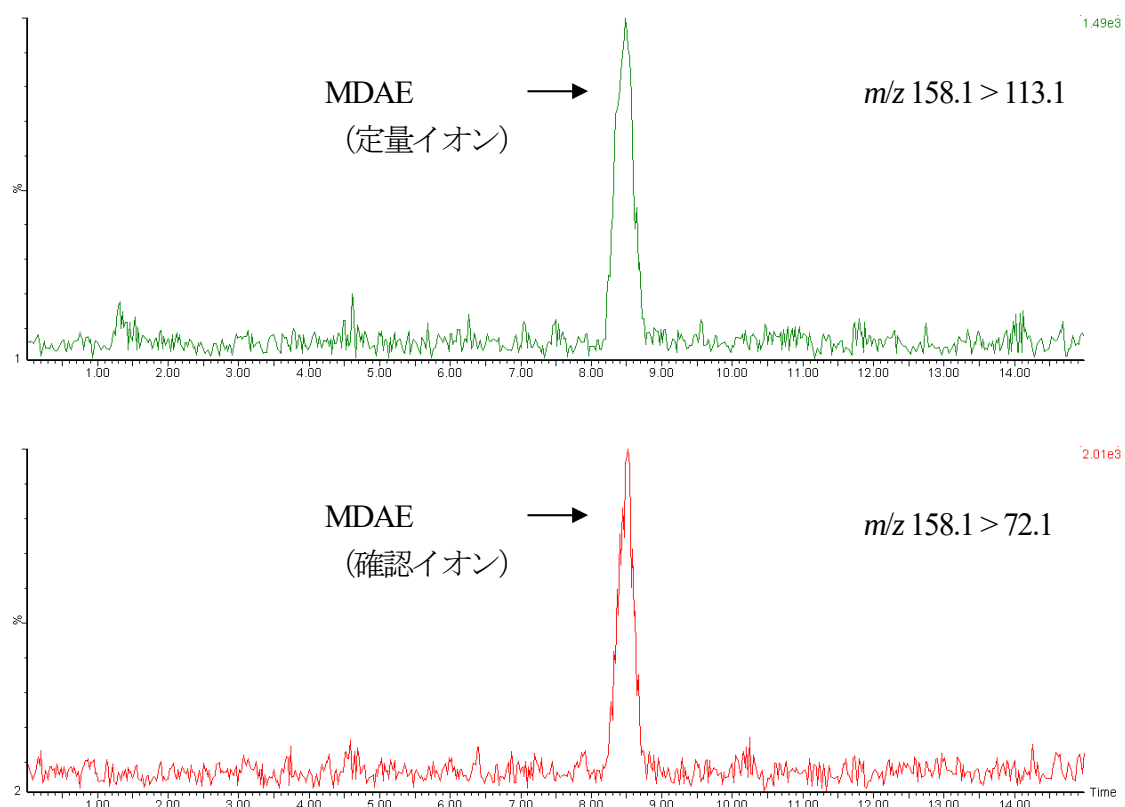


図1 IDL 測定時のクロマトグラム

(注4) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って表 4 のとおりに算出した。また、図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果 (詳細)

対象物質名	MDAE	回収率(%)
試料	河川水	-
試料量 (L)	0.10	-
標準添加量 (μg)	0.0010	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.010	-
最終液量 (mL)	20	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.050	-
装置注入液量 (μL)	2.0	-
操作ブランク平均 (μg/L) ^{*1}	<0.0015	
無添加平均 (μg/L) ^{*2}	<0.0015	
結果 1 (μg/L)	0.0104	104
結果 2 (μg/L)	0.0103	103
結果 3 (μg/L)	0.0110	110
結果 4 (μg/L)	0.0109	109
結果 5 (μg/L)	0.0110	110
結果 6 (μg/L)	0.0105	105
結果 7 (μg/L)	0.0100	100
平均値 (μg/L)	0.01057	105.7
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.000385	
MDL (μg/L) ^{*3}	0.0015	
MQL (μg/L) ^{*4}	0.0039	
S/N 比	34	
CV (%)	3.6	

*1: 空白試験液を測定した値の平均値 (n=2)

*2: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

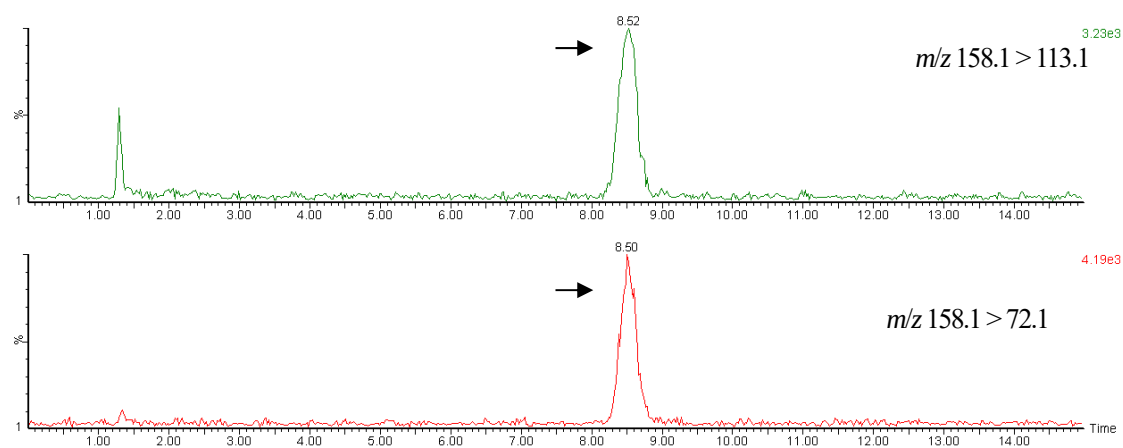


図2 MDL 測定時のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

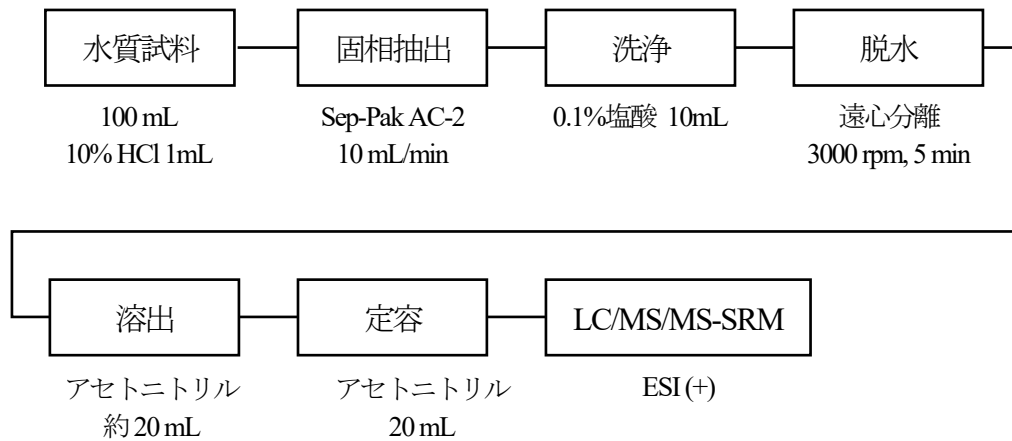


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図4-1及び4-2に、検量線作成用データを表5に示す。検量線測定時のクロマトグラムを図5に示す。

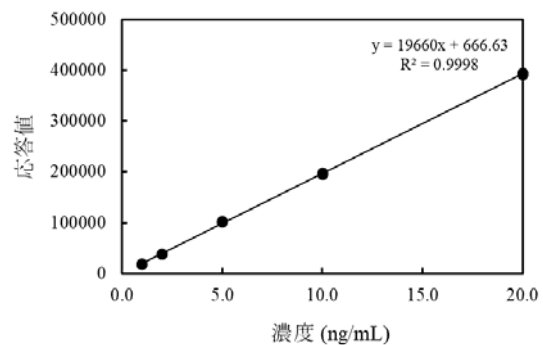
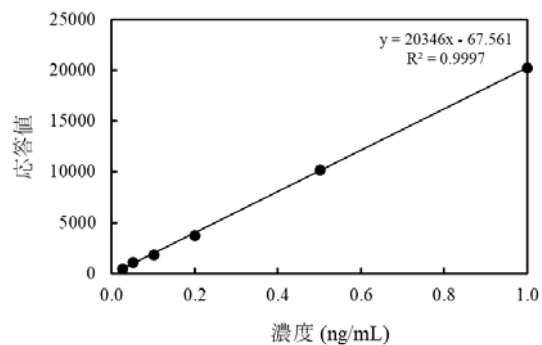


図4-1 低濃度域検量線 (0.025~1.0 ng/mL) 図4-2 高濃度域検量線 (1.0~20 ng/mL)

表 5 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	応答値
	MDAE m/z 158.1 > 113.1
0.025	476
0.05	1130
0.10	1891
0.20	3774
0.50	10197
1.0	20276
2.0	39322
5.0	101353
10	195976
20	392215

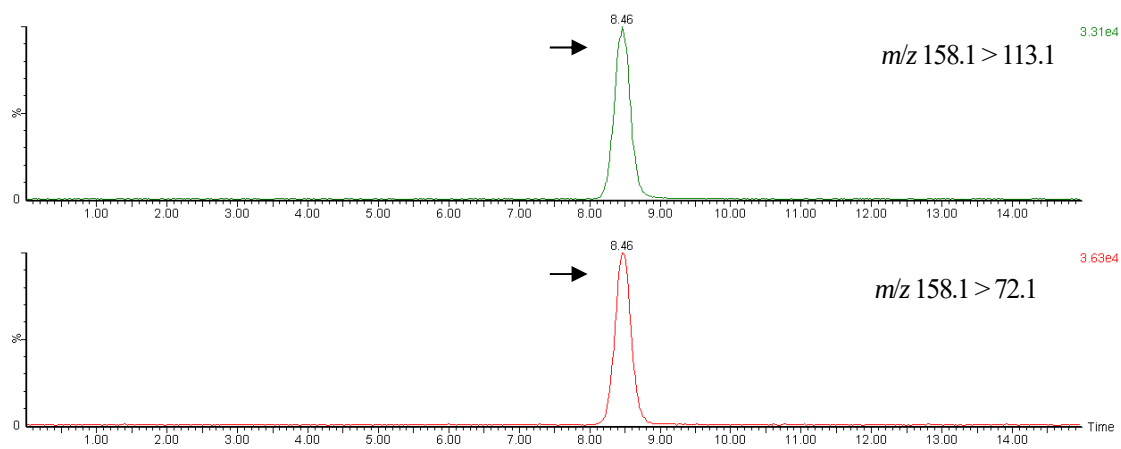


図 5 MDAE (0.50 ng/mL)のクロマトグラム

[マススペクトル]

MDAE のマススペクトル及びプレカーサーイオン m/z 158.1 に対するプロダクトイオンを図 6 に示す。

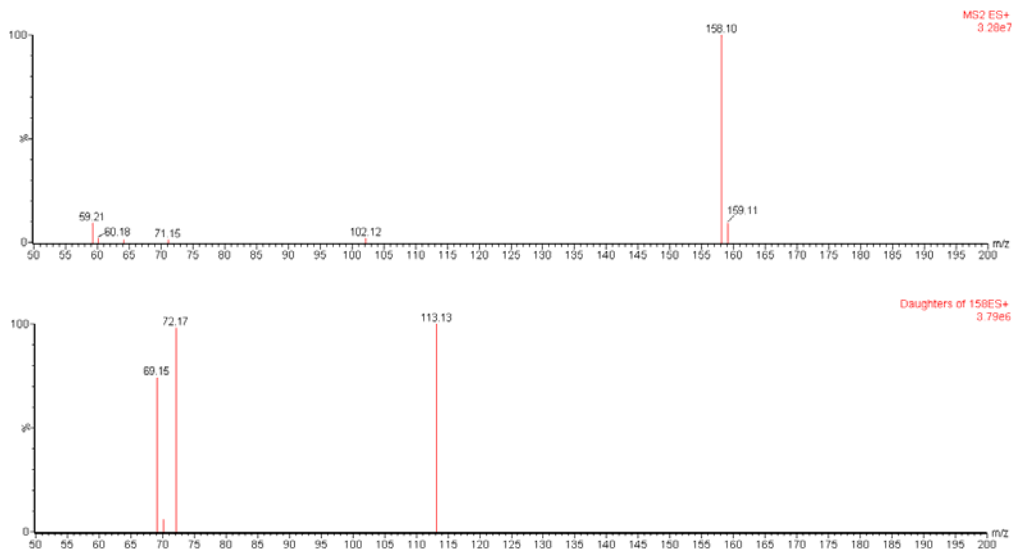


図 6 MDAE のマススペクトル(上図)及びプレカーサーイオン m/z 158.1 に対するプロダクトイオンスペクトル(下図)

[操作ブランク試験]

操作ブランク試験結果を表 6 に、クロマトグラムを図 7 に示す。

表 6 操作ブランク試験結果

物質名	試験数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)
MDAE	2	<0.0015

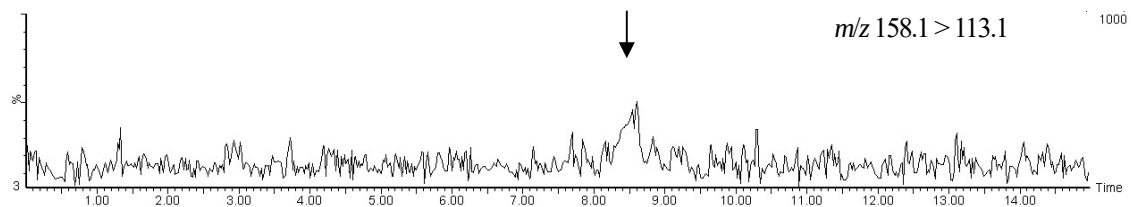


図 7 操作ブランク試験のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（雷山川）、海水（大牟田沖）への添加回収試験結果を表7に、クロマトグラムを図8-1及び8-2に示す。

表7 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (μg)	最終液量 (mL)	試験 数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動係数 (%)
MDAE	河川水	0.100	0.0	20	2	<0.0015	-	-
		0.100	0.00100	20	7	0.0106	106	3.6
	海水	0.100	0.0	20	2	<0.0015	-	-
		0.100	0.00500	20	5	0.0495	99	2.1

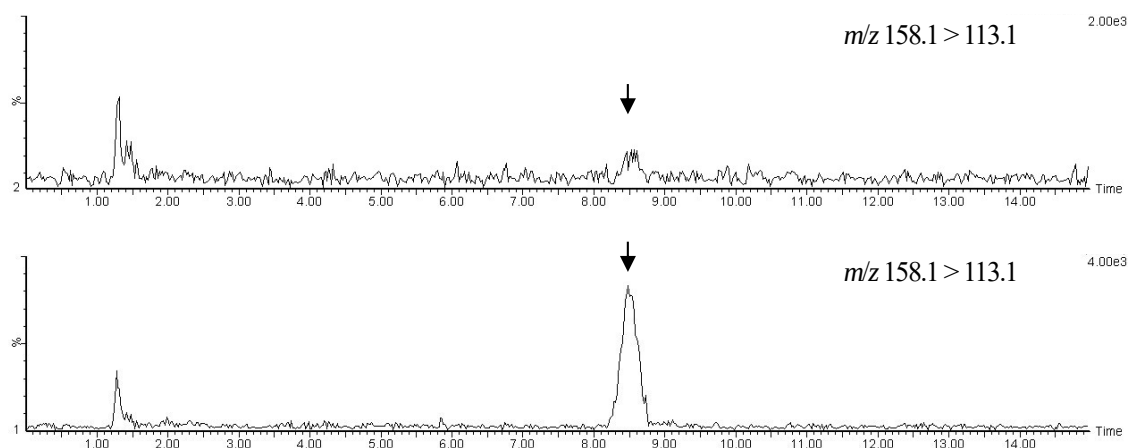


図8-1 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム
（上図：無添加試料、下図：添加試料）

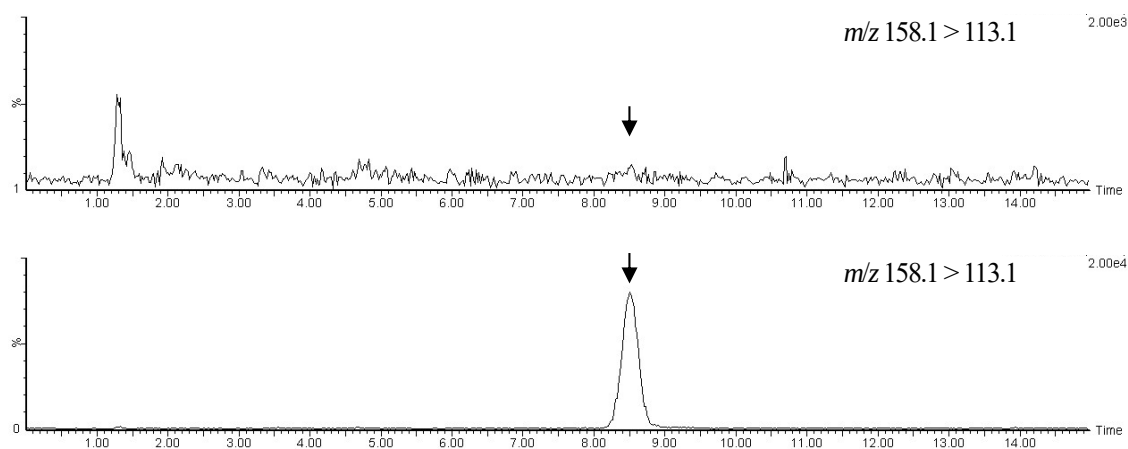


図8-2 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（上図：無添加試料、下図：添加試料）

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 8 に示す。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

pH	試験 数	調製濃度 (ng/mL)	1 時間 放置後	検出濃度 (ng/mL) (残存率(%))*			
				2 日間放置後		7 日間放置後	
				暗所	明所	暗所	明所
5	2	0.20	0.21 (104)	0.20 (100)	-	0.20 (100)	-
7	2	0.20	0.20 (102)	0.14 (72)	0.13 (64)	0.062 (31)	0.045 (23)
9	2	0.20	0.18 (92)	<0.0015 (0)	-	<0.0015 (0)	-
(0.1% HCl)	2	0.20	0.19 (97)	0.19 (96)	<0.0015 (0)	0.19 (95)	<0.0015 (0)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 9 に示す。環境試料の保存性試験は、水質試料 0.10 L をポリエチレン製容器に入れ、10%塩酸を 1 mL 添加した後、1.5 ng の MDAE を添加した。これを冷蔵保存し、7 日後に測定した。粗抽出液は、添加回収試験で得られた最終試験液を冷蔵保存し、14 日後に測定した。

表 9 保存性試験結果

試料名		試験 数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%))*		
				7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	2	0.015	0.0134 (89)	-	-
	粗抽出液	2	0.075	-	0.0813 (108)	-
海水	試料	2	0.015	0.0152 (102)	-	-
	粗抽出液	2	0.075	-	0.0938 (125)	-
標準液	MDL の 10 倍程度	2	0.050	-	-	0.0503 (98)
	検量線最高濃度	2	20	-	-	19.8 (99)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔試料に添加する酸の検討〕

MDAE は、中性～アルカリ性条件下の水中では安定性が悪いことが確認された(表 8)。そのため、保存性を高めるためには試料採取後に酸を加える必要があると考えられた。そこで酸の違いによる保存性や回収率への影響を確認するため、塩酸、ギ酸及びアスコ

ルビン酸を用いて添加回収試験を行った。

精製水 100 mL に対し、塩酸及びギ酸は 0.1%、アスコルビン酸は 1% となるように調製し、これに MDAE を 10 ng 添加して試料水とした。あらかじめアセトニトリル及びそれぞれの酸各 10 mL でコンディショニングした固相カートリッジに試料水を 10 mL/min で通水した。通水後、それぞれの酸 10 mL で洗浄し、遠心分離 (3000rpm, 5 min) により脱水後、アセトニトリル約 10 mL でバックフラッシュ法により溶出し、アセトニトリルで 10 mL に定容した。

結果を表 10 に示す。加える酸の違いにより、対象物質の保持時間及び回収率に差がみられた。これらの条件の中では 0.1% 塩酸が最も良いと考えられた。

表 10 酸の違いによる固相抽出検討結果

試料	保持時間 (分)	回収率 (%)
MDAE 標準液	8.32	-
0.1% 塩酸精製水	8.41 (+0.09)	100.6
0.1% ギ酸精製水	8.66 (+0.34)	46.6
1% アスコルビン酸精製水	8.79 (+0.47)	81.8

〔環境試料の分析〕

本法を用いて福岡県内の河川水 (雷山川) 及び海水 (大牟田沖) を測定した結果、MDAE はいずれも検出されなかった (図 8-1 及び図 8-2)。

【評価】

環境水中に含まれるメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルの分析法を開発した。本分析法で用いた LC/MS/MS による分析対象物質の IDL は、0.012 pg (IDL 試料換算値 0.0012 µg/L) であり、0.025~20 ng/mL の範囲で直線性 ($r^2 > 0.999$) が確認された。固相抽出法による前処理を行う本分析法の MDL 及び MQL は、0.0015 µg/L 及び 0.0039 µg/L であった。河川水 100 mL に対象物質 0.0010 µg 添加したときの回収率は 106% (変動係数 3.6%)、海水 100 mL に対象物質 0.0050 µg 添加したときの回収率は 99% (変動係数 2.1%) であった。本分析法で福岡県内河川水及び海水を測定したところ、対象物質は検出されなかった。

以上の結果より、本法は、環境水試料中の 0.004 µg/L 程度のメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルの定量に適用可能であると判断される。

【担当者連絡先】

所属先名称 : 福岡県保健環境研究所

所属先住所 : 〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野 39

TEL : 092-921-9940 FAX 092-928-1203

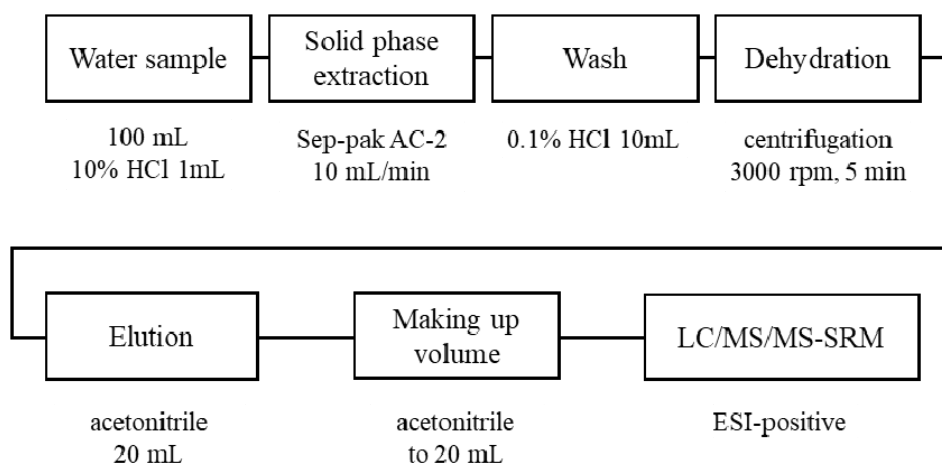
担当者名 : 高橋 浩司、塚谷 裕子

E-mail : takahashi@fihes.pref.fukuoka.jp

2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (MDAE)

This method provides procedures for the determination of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (MDAE) in water samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

One hundred mL of water sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Sep-Pak AC-2) at a flow rate of 10 mL/min. After the cartridge is washed with 10 mL of 0.1% HCl, the MDAE is eluted with 20 mL of acetonitrile through the cartridge. The eluate is then adjusted to 20 mL with acetonitrile for LC/MS/MS-SRM analysis. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) of MDAE are 0.0015 and 0.0039 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recovery ($n = 7$) from river water samples added with 0.0010 μg of MDAE was 106%, and the relative standard deviation (RSD) was 3.6%. The average recovery ($n = 5$) from sea water samples added with 0.0050 μg of MDAE was 99%, and the RSD was 2.1%.



物質名	分析法フローチャート	備考
メタクリル酸2- (ジメチルアミノ) エチル	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 100 mL 10% HCl 1 mL] --> B[固相抽出 Sep-pak AC-2 10 mL/min] B --> C[洗浄 0.1% HCl 10 mL] C --> D[脱水 遠心分離 3000 rpm, 5 min] D --> E[溶出 アセトニトリル 約 20 mL] E --> F[定容 アセトニトリル 20 mL] F --> G[LC/MS/MS-SRM ESI(+)] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM 検出下限値： 【水質】 (µg/L) 0.0015 分析条件： 機器 LC：Waters 製 AQUITY MS：Waters 製 Xevo TQ カラム Sigma-Aldrich 製 Discovery HS F5 2.1 mm×100 mm, 5 µm

りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル

Dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate

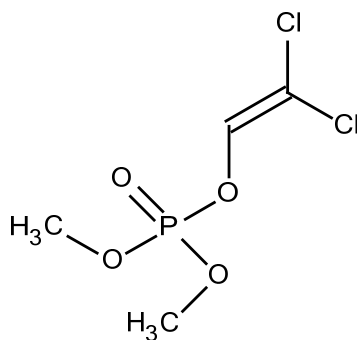
IUPAC 名：リン酸 2,2-ジクロロエテニルジメチル

2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate

別名：ジクロロボス

DDVP, Dichlorvos

【対象物質の構造】



CAS 番号：62-73-7

分子式：C₄H₇Cl₂O₄P

【物理化学的性状】

分子量 (モノイットピック質量)	比重 (g/cm ³)	沸点 (°C)	蒸気圧 (mmHg)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
220.98 (219.9459)	1.415 ¹⁾	140 ¹⁾ (20 mmHg)	0.0158 ²⁾ (0.0210 hPa*) (25°C)	10000 ²⁾ (20°C)	1.43 ³⁾

*：換算値（1 mmHg=1.33 hPaによる。）

【毒性、用途】

〔毒性〕

動物種	経路	致死量、中毒量等
マウス	経口	LD ₅₀ : 61 mg/kg ⁴⁾
	吸入	LC ₅₀ : 13 mg/m ³ (4 hr) ⁴⁾
ラット	経口	LD ₅₀ : 17 mg/kg ⁴⁾
	吸入	LC ₅₀ : 15 mg/m ³ (4 hr) ⁴⁾

〔用途〕

殺虫剤、動物用医薬品 ⁵⁾

出典

- 1) O'Neil, M.J. (2001): The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition. Merck Co Inc.
- 2) Tomlin, C. (1997): The Pesticide Manual: A World Compendium 11th Edition. British Crop Protection Council.
- 3) Hansch, C., A. Leo and D. Hoekman (1995): Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society.
- 4) US National Institute for Occupational Safety and Health Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Database.
- 5) 化学工業日報社(2002) : 14102 の化学商品

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にギ酸を添加した後、サロゲート内標準物質を添加し、固相カートリッジに通水する。固相カートリッジを洗浄、脱水後、アセトニトリルで溶出し、濃縮する。0.1%ギ酸で定容し、LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive)法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル (DDVP)

: AccuStandard 製 (100 µg/mL メタノール溶液)

DDVP-*d*₆

: Cambridge Isotope Laboratories 製 (純度 98%)

メタノール	: 富士フィルム和光純薬製、LC/MS 用
アセトニトリル	: 富士フィルム和光純薬製、LC/MS 用
ギ酸	: 富士フィルム和光純薬製、LC/MS 用
精製水	: 富士フィルム和光純薬製 超純水、LC/MS 用
固相カートリッジ	: Waters 製、Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge

【標準液の調製】

〔標準液〕

市販の 100 µg/mL (メタノール溶液) を標準原液とする。標準原液(100 µg/mL) をメタノールで希釈し、1.0 µg/mL の標準液とする。

〔サロゲート内標準液〕

サロゲート内標準物質 (DDVP- d_6) を 10.0 mg 量りとり、メタノールで 100 mL として 100 µg/mL のサロゲート内標準原液を調製する。これをメタノールで希釈し、1.0 µg/mL のサロゲート内標準液とする。

〔検量線用標準液〕

DDVP の 1.0 µg/mL 標準液を 0.1%ギ酸/アセトニトリル(8:2)溶液で順次希釈し、0.50 ng/mL～100 ng/mL の検量線用標準液を作成する。各標準液には、サロゲート内標準液 (DDVP- d_6 1.0 µg/mL) を 10 ng/mL の濃度になるように添加する。

【器具】 (注 1)

マイクロシリンジ(10 µL)、メスフラスコ(10～100 mL)、ホールピペット(0.5～5 mL)、共栓付メスシリンダー(200 mL)、固相抽出装置、ガラス注射筒(10 mL)、共栓付遠沈管(10 mL)、パスツールピペット、LC オートサンプラー用バイアル

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従う。試料はガラス容器に採取後、速やかに分析を行う。速やかに行えない場合はギ酸を河川水であれば 0.1%、海水であれば 1%となるように添加した後、冷暗所に保存し、7 日以内を目安に分析を行う。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 200 mL にギ酸 (河川水は 0.2 mL、海水は 2 mL、試料採取後に添加

した場合は省略)を添加した後、サロゲート内標準液(1.0 µg/mL)10 µL (10 ng 相当)を添加し、あらかじめコンディショニングした固相カートリッジ (注 2) に 10 mL/min で通水する。通水後の固相カートリッジを精製水/メタノール(1:1) 溶液 10 mL で洗浄した後、ガラス注射筒で空気約 20 mL を通気して脱水し、アセトニトリル 6 mL で溶出する。溶出液を窒素気流下で 0.2 mL まで濃縮した後、0.1%ギ酸 0.8 mL を加え 1 mL に定容し、試験液とする。

【空試験液の調製】

水質試料の代わりに精製水を用いて、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

【LC/MS 条件】 (注 3)

[LC 条件]

使用機器	: 島津製作所 Nexera X2
カラム	: Waters 製 Xbridge C18, 150 mm×2.1 mm, 3.5 µm
移動相	: A : 0.1% ギ酸、B : アセトニトリル
	0→1 min : A:B = 80:20
	1→5 min : A:80→10, B:20→90
	5→15 min : A:B = 10:90
	15→16 min : A:10→80, B:90→20
	16→21 min : A:B = 80:20
カラム流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 10 µL

[MS 条件]

使用機器	: 島津製作所製 LCMS-8050
ドライイングガス流量	: 10 L/min
ネブライザーガス流量	: 2 L/min
イオン化法	: ESI-positive
インターフェース電圧	: 4.0 kV
ヒーティングガス流量	: 10 L/min
インターフェース温度	: 350°C
脱溶媒管(DL)温度	: 250°C
ヒートブロック温度	: 400°C

モニターイオン（注 4）、コリジョン電圧

: DDVP

m/z 223.0 > 109.1 : 17 V（定量用）

m/z 221.2 > 109.1 : 17 V（確認用）

: DDVP- d_6

m/z 229.2 > 115.1 : 19 V（定量用）

m/z 227.2 > 115.1 : 18 V（確認用）

〔検量線〕

検量線用標準液 10 μ L を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準物質の濃度比及び得られた面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 10 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られた対象物質とサロゲート内標準物質の面積比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

試料中の濃度 $C(\text{ng/L})$ は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準物質に対する対象物質の濃度比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準物質の量 (ng)

V : 試料水量 (L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 10 \text{ (ng)}$$

（添加するサロゲート内標準液の濃度 (1.0 ng/ μ L) $\times$ 添加するサロゲート内標準液の容量 (10 μ L)）

$$V = 0.20 \text{ (L)}$$

すなわち、

$$C = R \times 50 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す（注 5）。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
DDVP	0.60	0.20	1.0	0.00030

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析における MDL 及び MQL を表 2 に示す。(注 6)

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
DDVP	河川水	0.20	1.0	0.00039	0.0010
	海水	0.20	1.0	0.00043	0.0011

注 解

- (注 1) マイクロシリンジ(10 μL)は精度保証範囲±1%以下のものが望ましい。
メスフラスコ(10～100 mL)、ホールピペット(0.5～5 mL)及び共栓付メス
シリンダー(200 mL)は JIS R 3505 に記載のクラス A のガラス器具を使用
する。
- (注 2) 固相カートリッジは、使用直前にメタノール 10 mL、精製水 10 mL でコ
ンディショニングする。
- (注 3) LC/MS/MS の条件は、本測定に使用した機種に特有のものである。感度
が不安定な場合は、アセトニトリルを数回打ってから測定を行う。
- (注 4) m/z 221.2 > 109.1 をモニターした場合に過度なベースラインノイズが確
認されたことから、ベースラインノイズの小さい m/z 223.0 > 109.1 を定
量用とし、 m/z 221.2 > 109.1 は確認用とした。 m/z 221.2 > 109.1 をモニタ
ーした場合にベースラインノイズが小さければ、 m/z 221.2 > 109.1 を定
量用としてもよい。

(注 5) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って表 3 のとおり算出した。図 1 に IDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 3 IDL の算出結果 (詳細)

物質名	DDVP
試料量 (L)	0.20
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.50
注入量 (pg)	5.0
装置注入量 (μL)	10
結果 1 (pg)	4.62
結果 2 (pg)	4.40
結果 3 (pg)	4.58
結果 4 (pg)	4.65
結果 5 (pg)	4.36
結果 6 (pg)	4.69
結果 7 (pg)	4.78
平均値 (pg)	4.584
標準偏差 (σ_{n-1}) (pg)	0.153
IDL (pg) ^{*1}	0.60
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.00030
S/N 比	21
CV (%)	3.3

* : $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

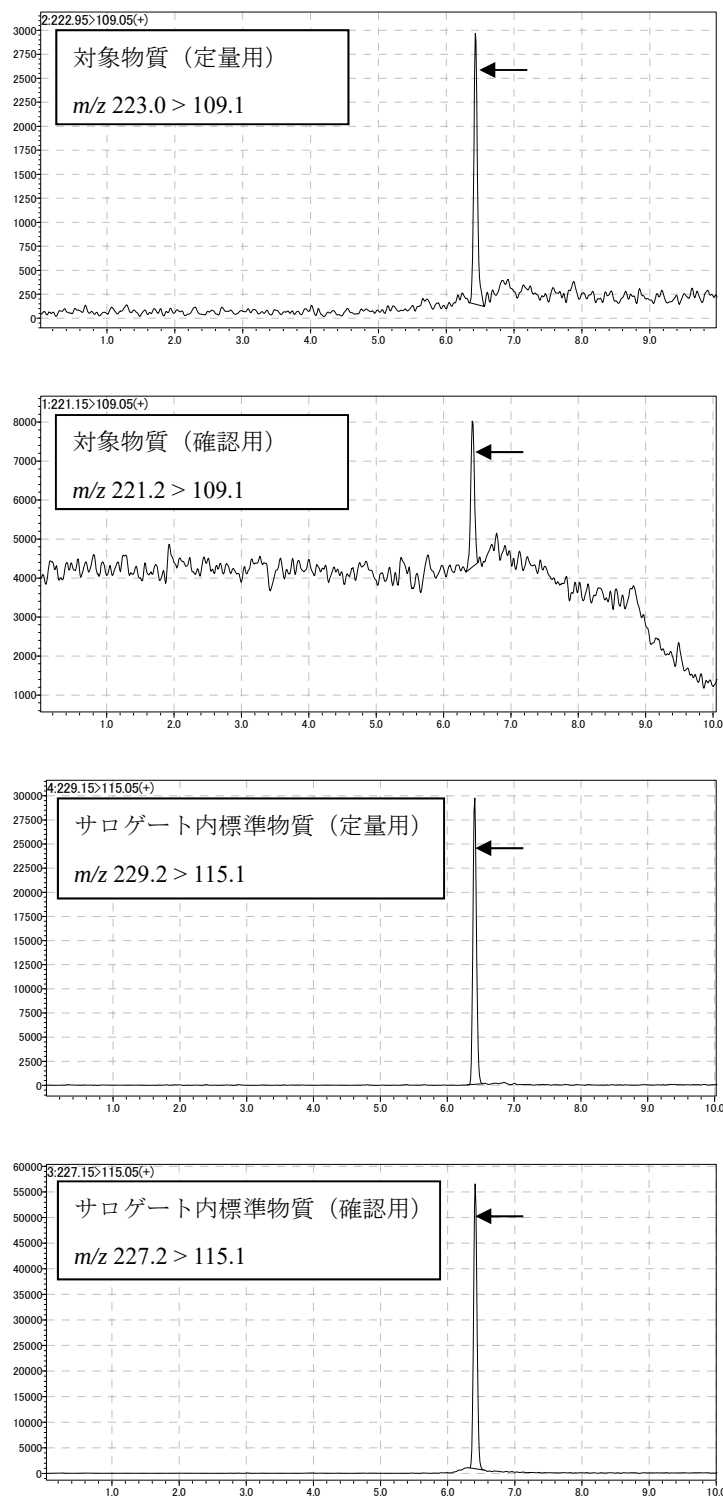


図1 IDL 測定時のクロマトグラム
(対象物質濃度：0.50 ng/mL、サロゲート内標準物質濃度：10 ng/mL)

(注 6) MDL 及び MQL は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って表 4-1 及び表 4-2 のとおり算出した。図 2-1 及び図 2-2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 4-1 MDL 及び MQL の算出結果 (河川水) (詳細) *1

物質名	DDVP	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	河川水 (雷山川)	-	-
試料量 (L)	0.20	-	-
標準添加量 (ng)	0.50	-	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.0025	-	-
最終液量 (mL)	1.0	-	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	-	-
装置注入量 (µL)	10	-	-
操作ブランク平均*2 (µg/L)	< 0.00039	-	97
無添加平均*3 (µg/L)	< 0.00039	-	83
結果 1 (µg/L)	0.00228	91	82
結果 2 (µg/L)	0.00241	96	92
結果 3 (µg/L)	0.00223	89	81
結果 4 (µg/L)	0.00234	94	93
結果 5 (µg/L)	0.00238	95	94
結果 6 (µg/L)	0.00253	101	82
結果 7 (µg/L)	0.00230	92	90
平均値 (µg/L)	0.002353	94.9	87.6
標準偏差 (σ_{n-1}) (µg/L)	0.000100		
MDL (µg/L) *4	0.00039		
MQL (µg/L) *5	0.0010		
S/N 比	21		
CV(%)	4.2		

*1 : 定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2 : 空試験液を測定した値の平均値($n = 2$)

*3 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値($n = 2$)

*4 : $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5 : $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

表 4-2 MDL 及び MQL の算出結果（海水）（詳細） *1

物質名	DDVP	補正後 回収率(%)	サロゲート 回収率(%)
試料	海水（大牟田沖）	-	-
試料量 (L)	0.20	-	-
標準添加量 (ng)	0.50	-	-
試料換算濃度 (μg/L)	0.0025	-	-
最終液量 (mL)	1.0	-	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	-	-
装置注入量 (μL)	10	-	-
操作ブランク平均*2 (μg/L)	< 0.00043	-	97
無添加平均*3 (μg/L)	< 0.00043	-	90
結果 1 (μg/L)	0.00235	94	93
結果 2 (μg/L)	0.00237	95	88
結果 3 (μg/L)	0.00222	89	92
結果 4 (μg/L)	0.00216	86	95
結果 5 (μg/L)	0.00214	86	94
結果 6 (μg/L)	0.00212	85	96
結果 7 (μg/L)	0.00234	94	94
平均値 (μg/L)	0.002244	89.8	93.2
標準偏差 (σ _{n-1}) (μg/L)	0.000110		
MDL (μg/L)*3	0.00043		
MQL (μg/L)*4	0.0011		
S/N 比	20		
CV(%)	4.9		

*1：定量結果は、サロゲート法により補正した値である。

*2：空試験液を測定した値の平均値(n = 2)

*3：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n = 2)

*4：MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*5：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

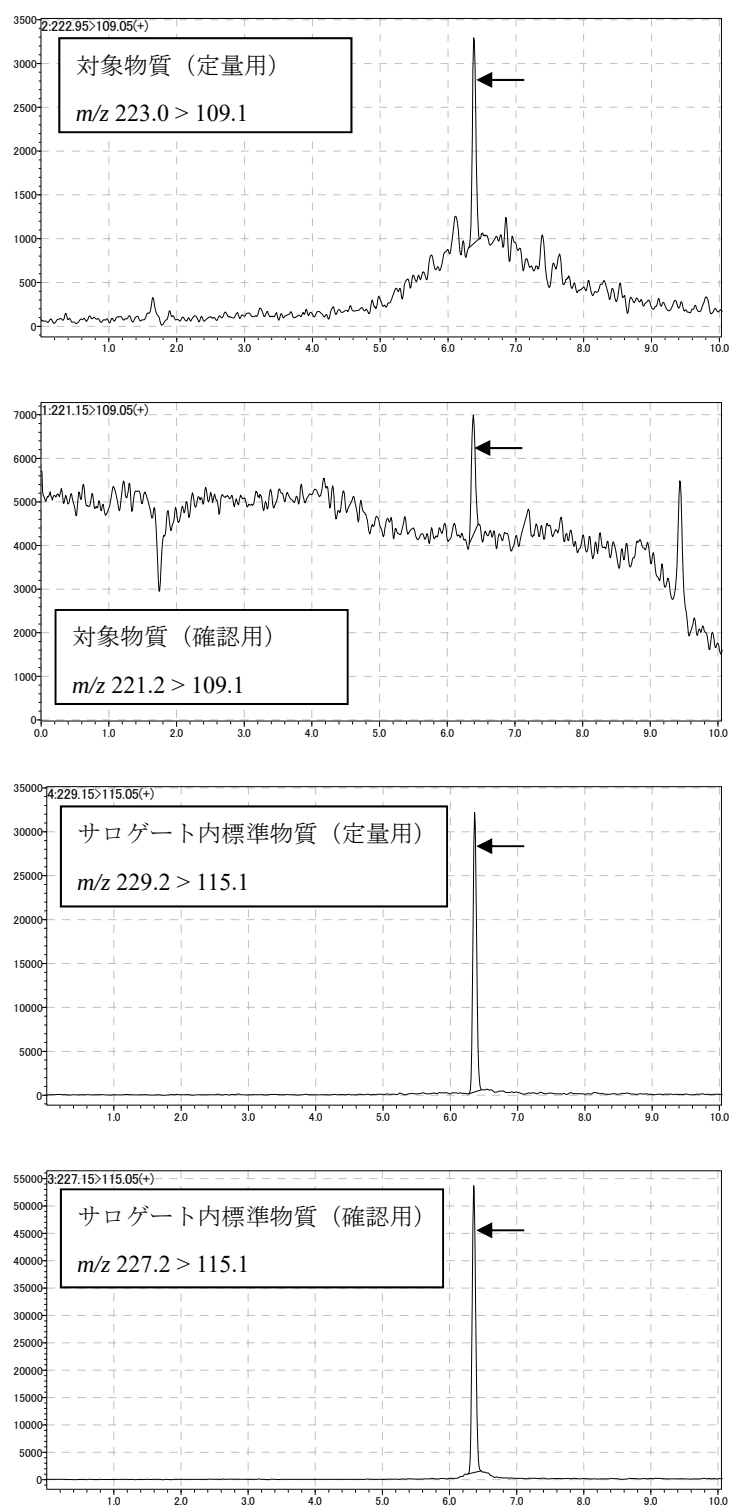


図 2-1 MDL 測定時のクロマトグラム
(河川水、DDVP 0.50 ng 添加)

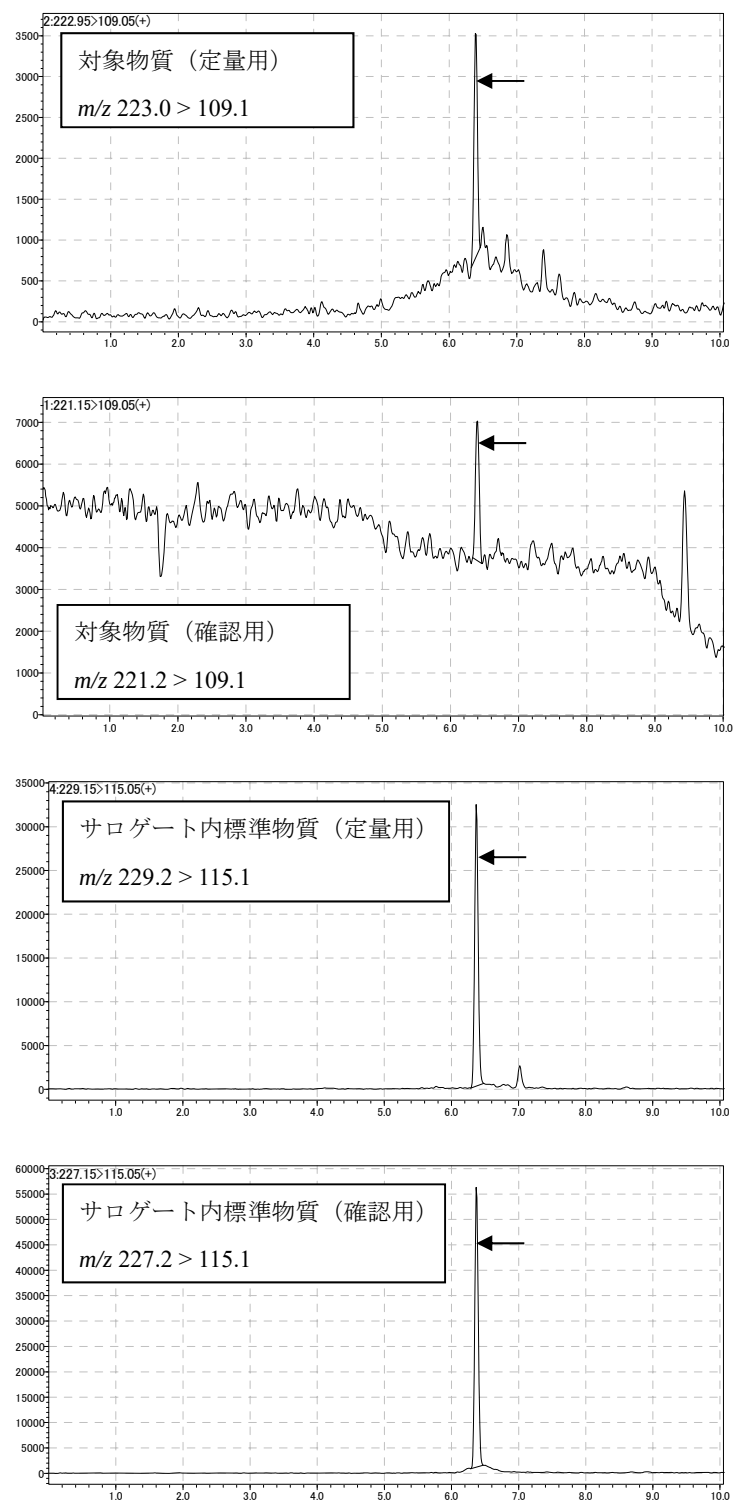


図 2-2 MDL 測定時のクロマトグラム
(海水、DDVP 0.50 ng 添加)

§ 2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図 3 に示す。

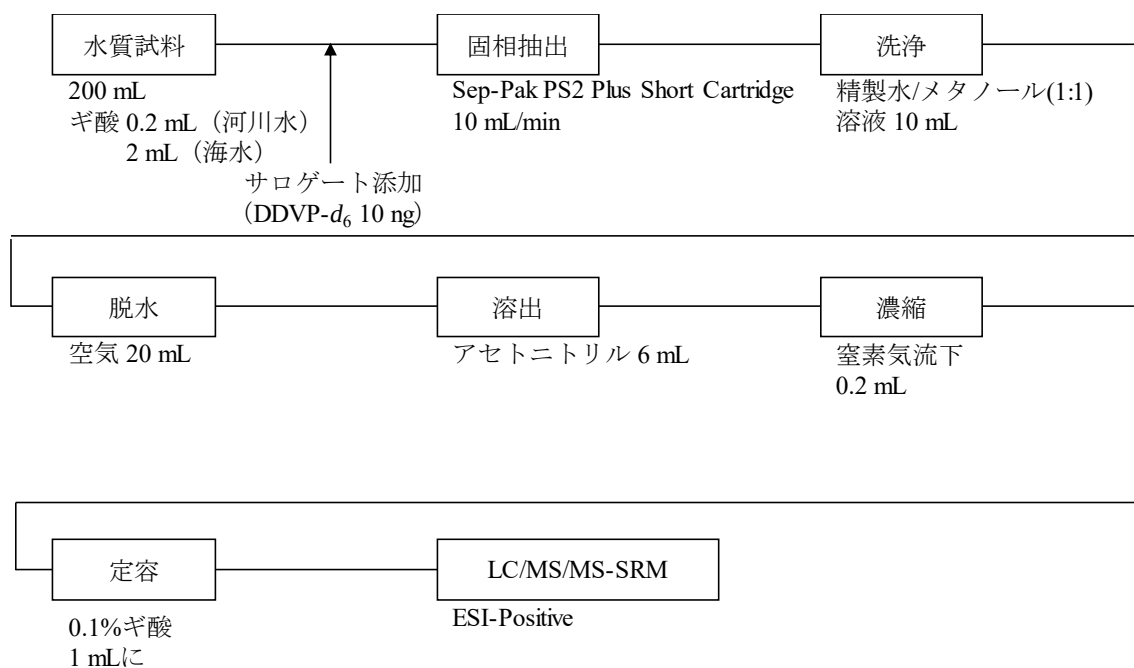


図 3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図 4-1 及び図 4-2 に、検量線データを表 5 に示す。

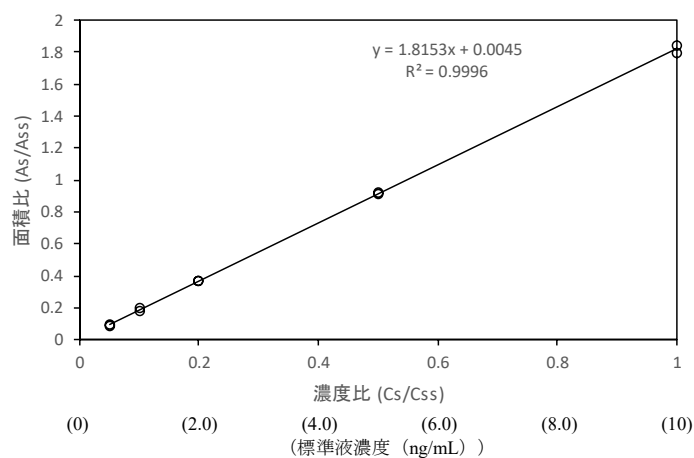


図 4-1 低濃度検量線 (0.50~10 ng/mL、サロゲート内標準物質 : 10 ng/mL)

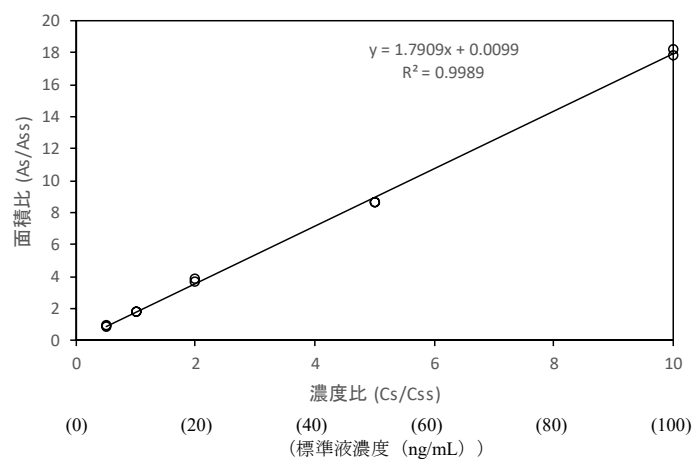


図 4-2 高濃度検量線（5.0～100 ng/mL、サロゲート内標準物質：10 ng/mL）

表 5 検量線作成用データ

標準液 濃度(Cs) (ng/mL)	濃度比 (Cs/Css*)	面積値		面積比 (As / Ass)
		対象物質(As)	内標準物質(Ass)	
		[DDVP] <i>m/z</i> 223.0 > 109.1	[DDVP- <i>d</i> ₆] <i>m/z</i> 229.2 > 115.1	
0.50	0.050	9236	110403	0.0837
0.50	0.050	10026	108466	0.0924
1.0	0.10	21395	108614	0.197
1.0	0.10	20213	110674	0.183
2.0	0.20	39626	106625	0.372
2.0	0.20	40234	109622	0.367
5.0	0.50	107828	116768	0.923
5.0	0.50	106203	116866	0.909
10	1.0	204192	113833	1.79
10	1.0	193083	104874	1.84
20	2.0	380910	99408	3.83
20	2.0	423670	114197	3.71
50	5.0	937231	108485	8.64
50	5.0	960645	111510	8.61
100	10	1907376	104418	18.3
100	10	1814511	101760	17.8

*：サロゲート内標準物質濃度：10 ng/mL

〔クロマトグラム〕

標準液のクロマトグラムを図5に示す。

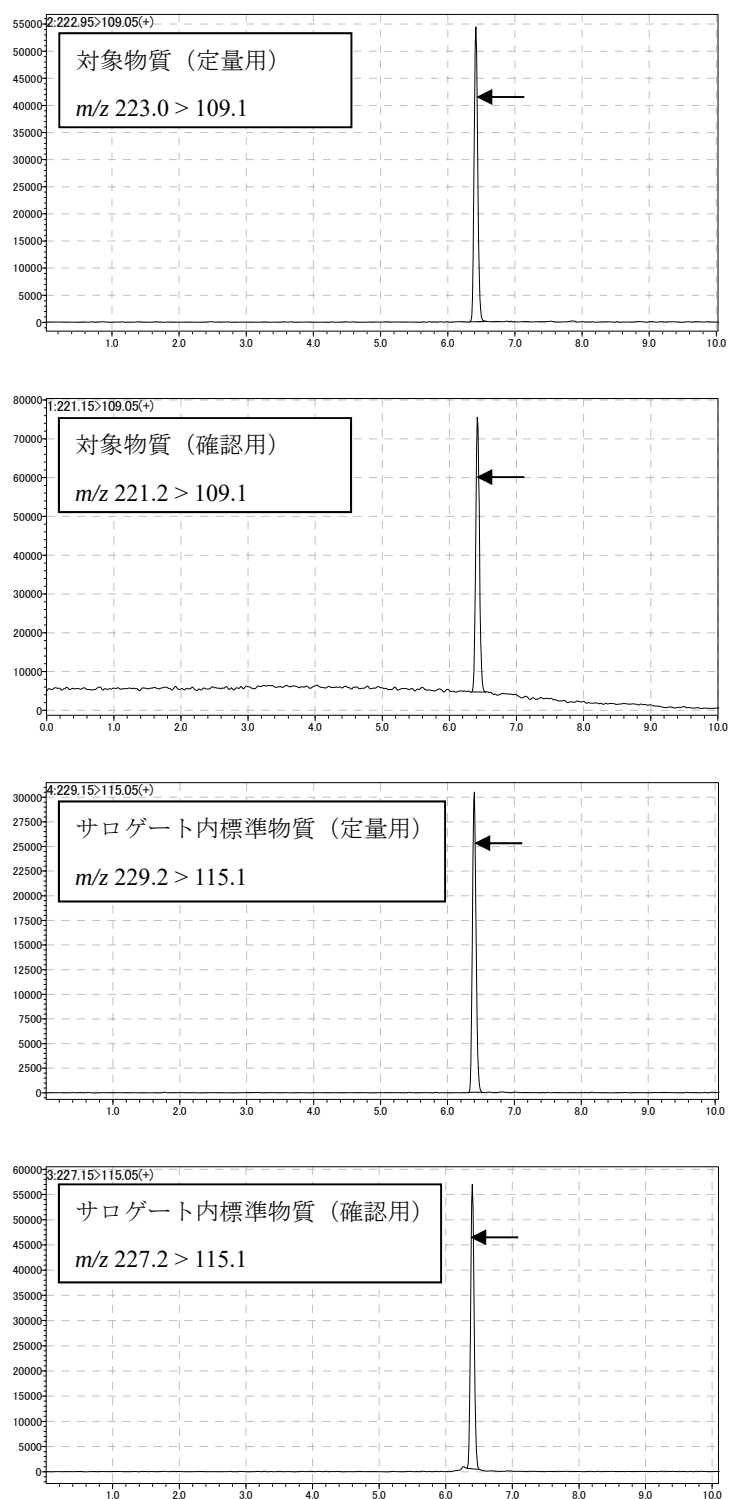


図5 標準液のクロマトグラム

(対象物質濃度：10 ng/mL、サロゲート内標準物質濃度：10 ng/mL)

[マススペクトル]

対象物質及びサロゲート内標準物質のマススペクトルを図 6-1 及び図 6-2 に、プレカーサーイオンに対するプロダクトイオンを図 7-1 及び図 7-2 に示す。

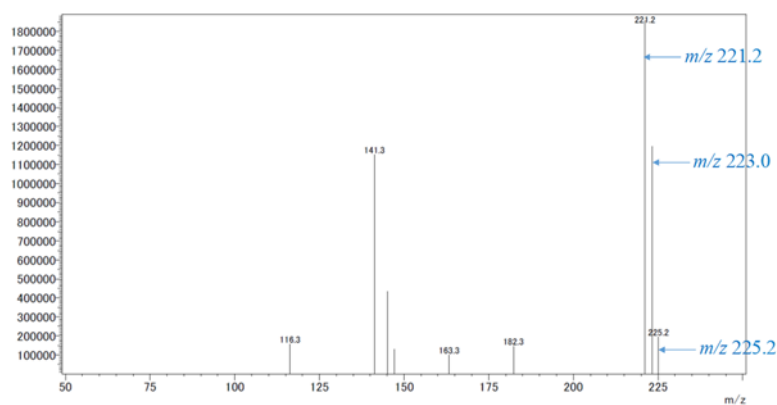


図 6-1 DDVP のマススペクトル

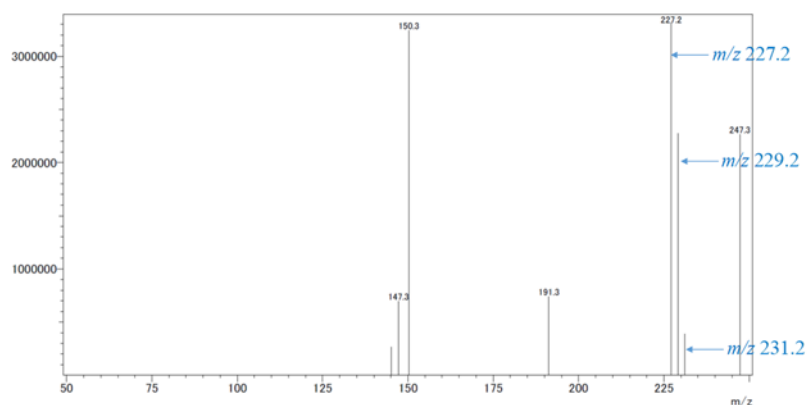


図 6-2 DDVP-d₆ のマススペクトル

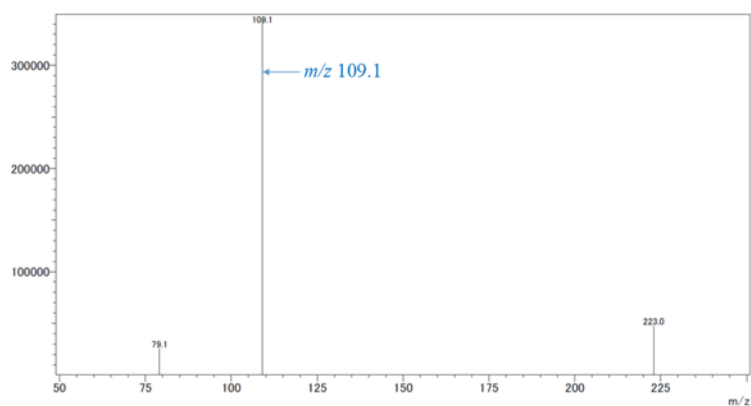


図 7-1 DDVP のプレカーサーイオン m/z 223.0 に対するプロダクトイオン

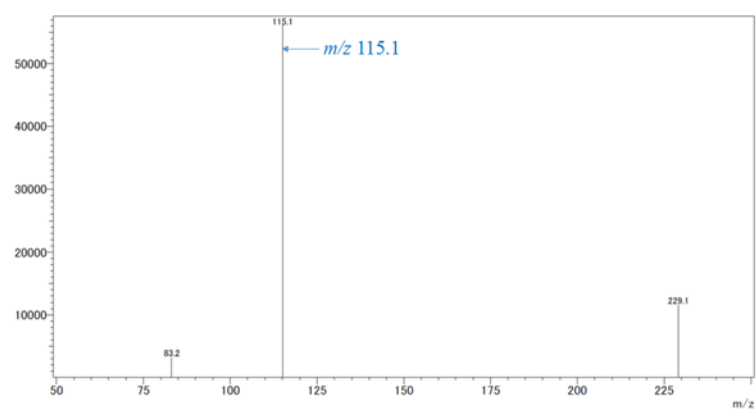


図 7-2 DDVP- d_6 のプレカーサーイオン m/z 229.2 に対するプロダクトイオン

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験結果を表 6 に、操作ブランク測定時のクロマトグラムを図 8 に示す。対象物質のピークは確認されなかった。

表 6 操作ブランク試験結果

物質名	試験数	検出濃度($\mu\text{g/L}$)
DDVP	2	< 0.00039

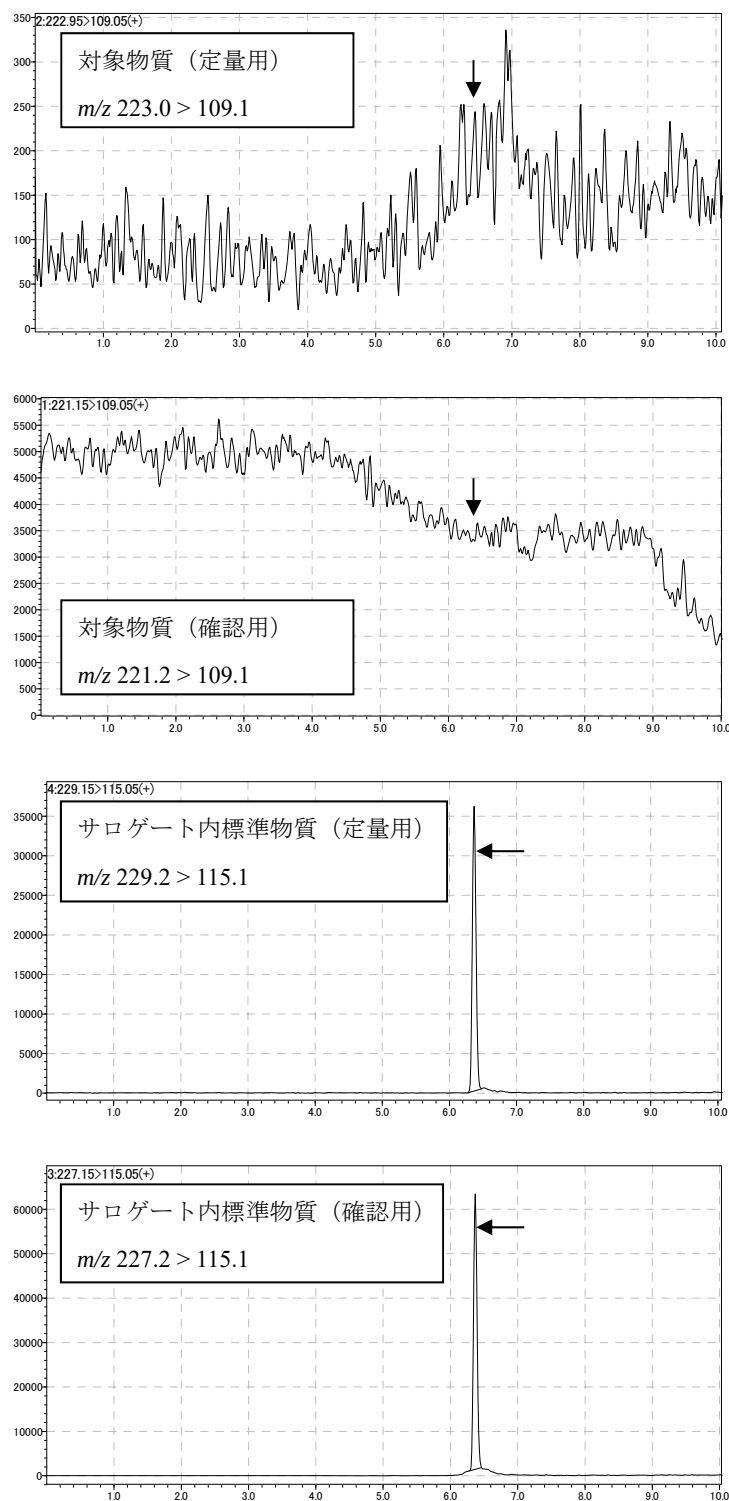


図 8 操作ブランク測定時のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（雷山川）及び海水（大牟田沖）を用いた添加回収試験結果を表 7 に、
添加回収試験測定時のクロマトグラムを図 9-1 から図 9-4 に示す。

表 7 添加回収試験結果

試料名	試料 量 (L)	添加 量 (ng)	最終 液量 (mL)	試 験 数	検出 濃度* (ng/L)	回収 率* (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
河川水	0.2	0	1.0	2	< 0.39	-	-	83
（雷山川）	0.2	5.0	1.0	6	24.0	96	3.4	84
海水	0.2	0	1.0	2	< 0.43	-	-	90
（大牟田沖）	0.2	5.0	1.0	6	23.7	95	2.4	93

*：検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

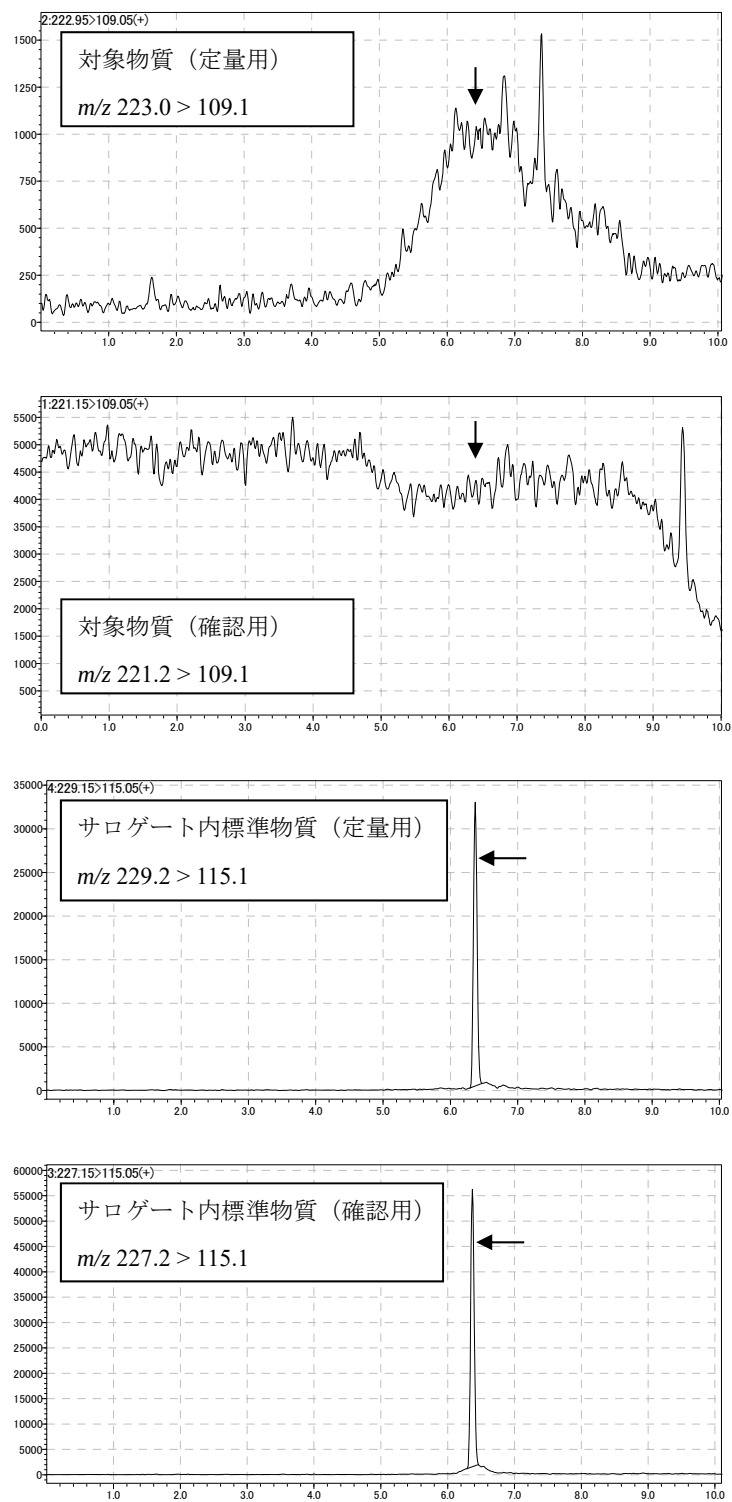


図 9-1 添加回収試験測定時のクロマトグラム（河川水、無添加試料）

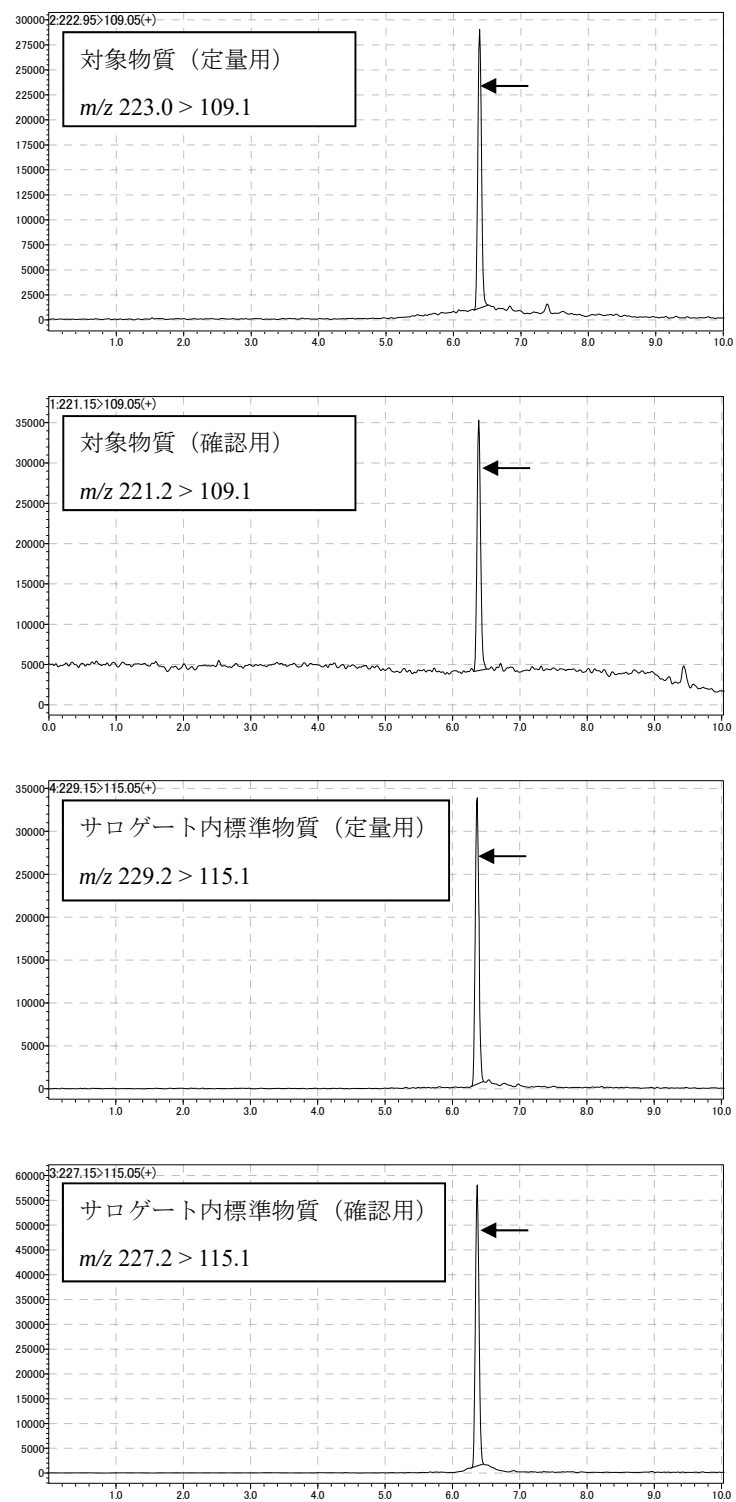


図 9-2 添加回収試験測定時のクロマトグラム（河川水、DDVP 5.0 ng 添加）

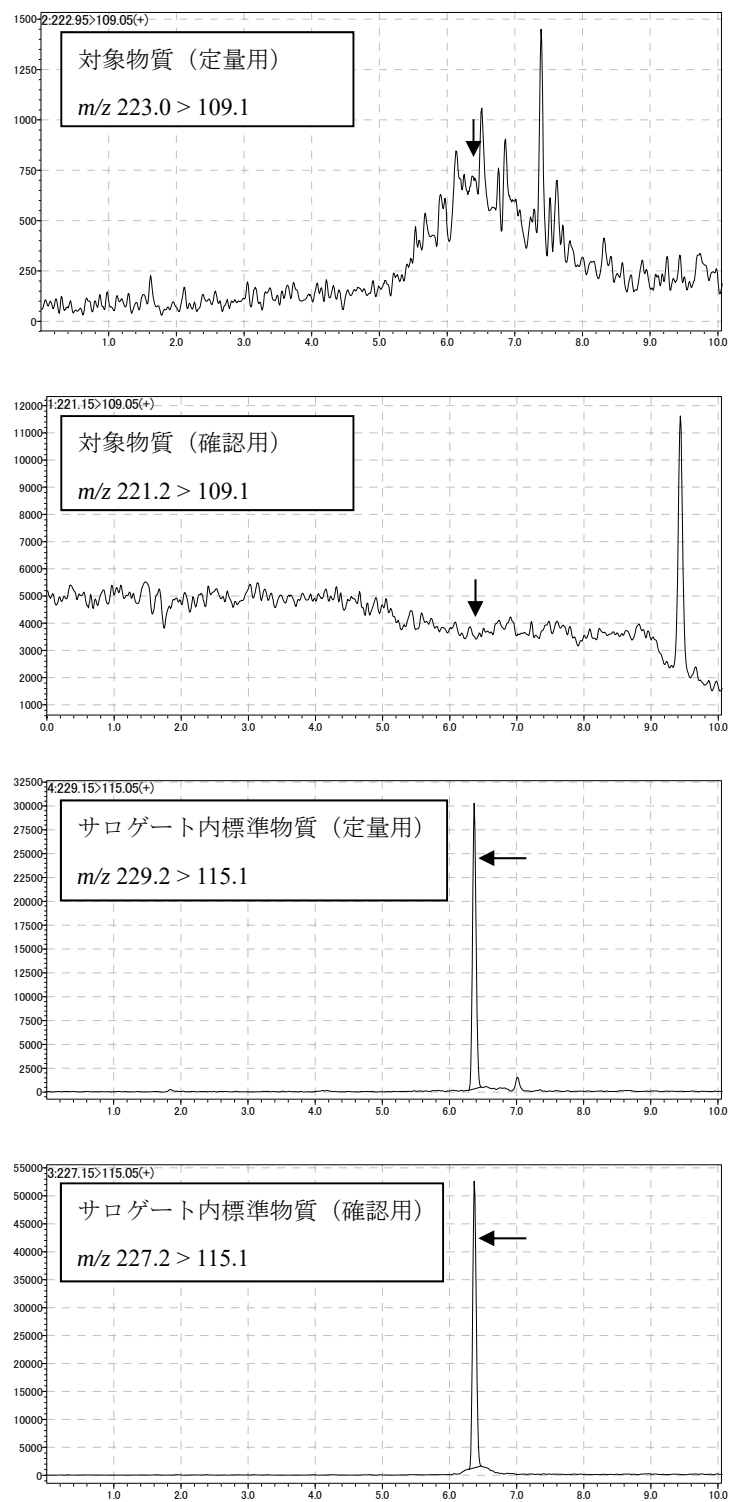


図 9-3 添加回収試験測定時のクロマトグラム（海水、無添加試料）

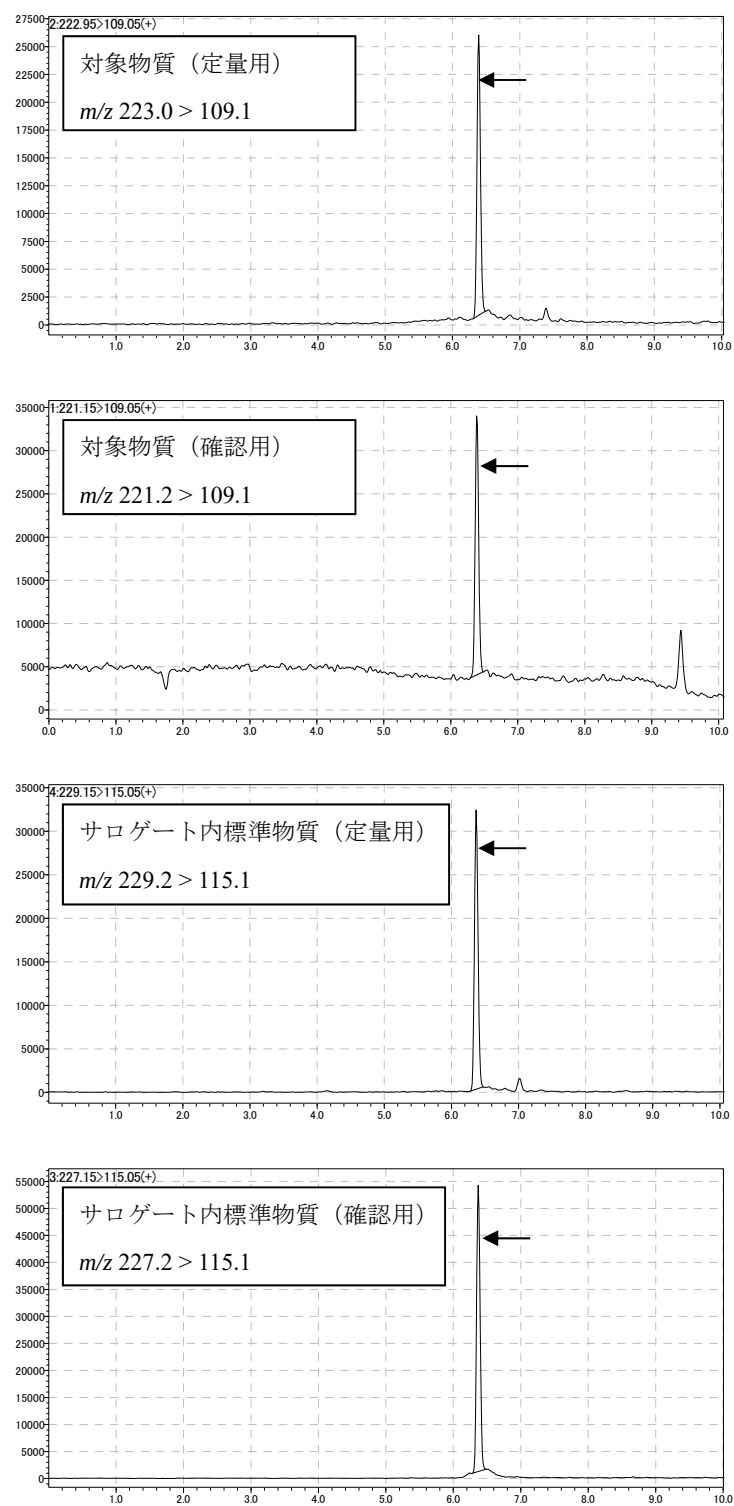


図 9-4 添加回収試験測定時のクロマトグラム（海水、DDVP 5.0 ng 添加）

〔分解性スクリーニング試験〕

ギ酸アンモニウム水溶液 10 mmol/L をギ酸及びアンモニア水で pH5、7 及び 9 に調整し、分解性スクリーニング試験を実施した。分解性スクリーニング試験結果を表 8 に示す。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

pH	試験数	調製濃度 (ng/L)	検出濃度(ng/L) (残存率(%)*)		
			1 時間後	7 日後	
				暗所	明所
5	3	5.0	5.2 (104)	4.5 (90)	4.5 (91)
7	3	5.0	4.9 (98)	4.3 (86)	4.1 (83)
9	3	5.0	4.8 (97)	2.4 (47)	2.5 (49)

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

保存性試験は、当日分析した試料を除いて、いずれも冷暗所(4°C)で所定の期間保存した後に分析した。

最終試験液は、河川水 200 mL を【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従い調製したものを保存試料とし、試料換算値で 5.0 ng/L になるよう DDVP を添加した。所定の期間が経過した後に DDVP-*d*₆ を添加して分析した。

粗抽出液は、河川水 120 mL を【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従いアセトニトリル 6 mL で溶出する操作まで行ったもの（20 倍濃縮（試料の濃縮倍率の 1/10 倍））を保存試料とし、試料換算値で 5.0 ng/L になるよう DDVP を添加した。所定の期間が経過した後に DDVP-*d*₆ を添加して分析した。

環境試料（河川水及び海水）は各試料 100 mL に 5.0 ng/L になるよう DDVP を添加した。所定の期間が経過した後に DDVP-*d*₆ を添加して測定分析した。また、環境試料 100 mL にギ酸を 0.1%または 1%となるように添加した試料についても同様に分析した。

保存性試験結果を表 9 に示す。標準液及び粗抽出液については 28 日後の残存率が 90%以上であった。また、最終試験液については 14 日後の残存率が 90%以上であった。環境試料（河川水及び海水）についてはギ酸を添加することで残存率が向上したため、ギ酸を河川水であれば 0.1%、海水であれば 1%となるように添加した後、冷暗所に保存し、残存率が 70%以上であった 7 日以内を目安に分析を行うことが望ましいと考える。

表 9 保存性試験結果

試料名	試験数	調製濃度 (ng/L)	検出濃度(ng/L) (残存率(%))*					
			当日	3 日後	5 日後	7 日後	14 日後	28 日後
標準液	3	5.0	4.8(96)	-	-	5.1(102)	5.1(103)	4.7(93)
粗抽出液	2	5.0	-	-	-	4.8(95)	4.8(96)	4.7(93)
最終試験液	2	5.0	4.6(93)	-	-	4.6(91)	4.8(95)	-
河川水	3	5.0	4.8(96)	-	-	3.7(73)	2.2(45)	<0.39(-)
河川水(ギ酸 0.1%)	3	5.0	-	-	-	4.0(80)	3.6(73)	3.3(67)
海水	3	5.0	4.7(95)	-	-	1.6(33)	0.28(5.6)	<0.43(-)
海水(ギ酸 0.1%)	3	5.0	-	4.4(89)	4.0(80)	3.3(67)	2.5(50)	1.3(25)
海水(ギ酸 1%)	3	5.0	-	4.4(87)	4.1(82)	3.9(78)	-	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

〔トリクロロホンとのカラム分離の検討〕

DDVP はトリクロロホン(DEP)の脱塩化水素反応により生成することが知られている¹⁾ことから、両者のカラム分離について検討した。【測定】の項に示した〔LC/MS 条件〕で、DDVP と DEP の混合標準液(それぞれ 10 ng/mL) 及び DEP 10 ng/mL を測定したクロマトグラムを図 10-1 及び図 10-2 に示す。図 10-1 から保持時間の違いにより DDVP と DEP が明確に分離できることが確認された。また、図 10-1 及び図 10-2 において、DEP の保持時間に DDVP が検出されなかったことから、本測定条件ではイオンソースで DEP が DDVP に分解しないことが確認された。一方、図 10-2 において、DDVP の保持時間に DDVP の微小なピークが確認されたことから、LC/MS/MS 注入前に DEP が DDVP に分解していた、あるいは DEP 標準液に DDVP が混入していた可能性が示唆された。

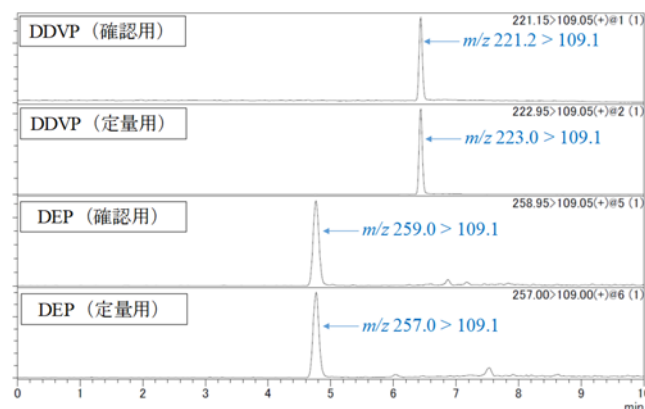


図 10-1 DDVP と DEP の混合標準液のクロマトグラム

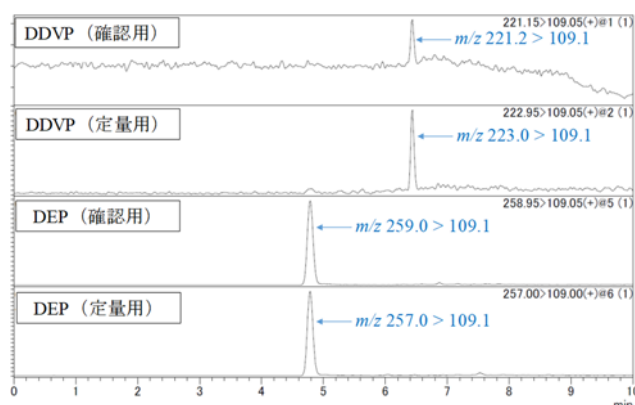


図 10-2 DEP 標準液のクロマトグラム

〔移動相条件の検討〕

移動相について、表 10 に示す 3 条件で DDVP と DEP の混合標準液（それぞれ 10 ng/mL）を測定した。それぞれのクロマトグラムを図 11-1 から図 11-3 に示す。保持時間や S/N を考慮し、Gradient 1 の条件で測定を行うこととした。

表 10 移動相条件

Isocratic 1	
移動相： A：0.1% ギ酸、B：アセトニトリル	
0→15 min	: A:B = 40:60
Gradient 1	
移動相： A：0.1% ギ酸、B：アセトニトリル	
0→1 min	: A:B = 80:20
1→5 min	: A:80→10, B:20→90
5→15 min	: A:B = 10:90
15→16 min	: A:10→80, B:90→20
16→21 min	: A:B = 80:20
Gradient 2	
移動相： A：0.1% ギ酸、B：アセトニトリル	
0→1 min	: A:B = 80:20
1→10 min	: A:80→10, B:20→90
10→20 min	: A:B = 10:90
20→21 min	: A:10→80, B:90→20
21→26 min	: A:B = 80:20

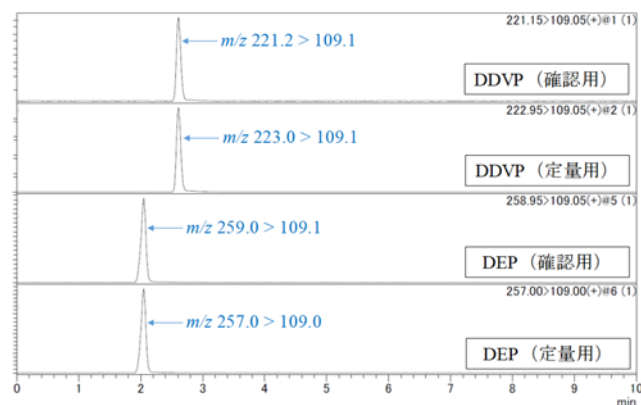


図 11-1 Isocratic 1 条件でのクロマトグラム

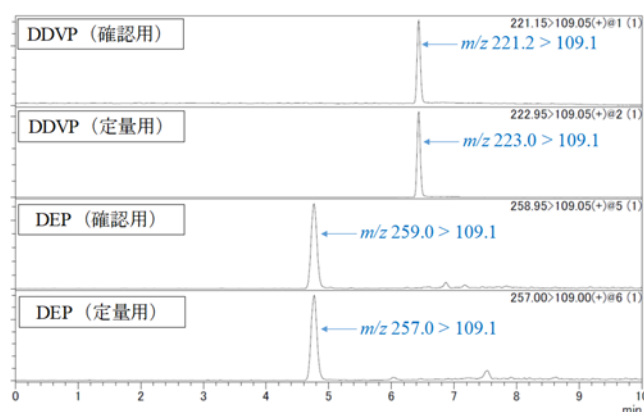


図 11-2 Gradient 1 条件でのクロマトグラム

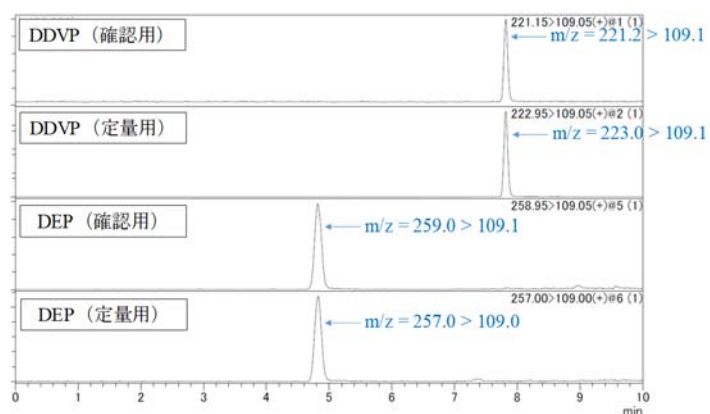


図 11-3 Gradient 2 条件でのクロマトグラム

〔固相カートリッジの検討〕

精製水 200 mL にギ酸 0.2 mL を添加した後、DDVP 5 ng、DDVP-d₆ 10 ng を添

加した。3種類の固相カートリッジ(Oasis HLB Plus, Sep-Pak PS2 Plus, Bond Elut Jr-Nexus)に通液、精製水 10 mL で洗浄し、空気約 20 mL で脱水して3種類の溶媒（メタノール、酢酸メチル、アセトニトリル）各 10 mL で溶出した。DDVP の回収率を表 11 に示す。表 11 から、固相カートリッジは Sep-Pak PS2 Plus を、溶出溶媒はアセトニトリルを用いることとした。また、Sep-Pak PS2 Plus について、精製水/メタノール(8:2)溶液及び精製水/メタノール(1:1)溶液それぞれ 10 mL で溶出を行った結果、DDVP 及び DDVP-*d*₆は検出されなかった。このことから、環境試料を前処理する際は、精製水/メタノール(1:1)溶液 10 mL で洗浄した後、溶出操作を行うこととした。

表 11 各固相カートリッジからの回収率 (%)

抽出溶媒	Oasis HLB Plus		Sep-Pak PS2 Plus		Bond Elut Jr-Nexus	
メタノール	94	(8)	96	(10)	99	(39)
酢酸メチル	106	(21)	95	(17)	89	(56)
アセトニトリル	92	(16)	90	(82)	99	(43)

*1：サロゲート補正後の回収率、n = 3 の平均値

*2：（ ）内はサロゲート内標準物質(DDVP-*d*₆)の回収率、ブランク試験含め n = 5 の平均値

〔溶出溶媒の分画試験〕

精製水 200 mL にギ酸 0.2 mL を添加した後、DDVP 5 ng、DDVP-*d*₆ 10 ng を添加した。Sep-Pak PS2 Plus に通液した後、空気約 20 mL で脱水し、精製水/メタノール(1:1)溶液 10 mL で洗浄した。続いてアセトニトリルを 2 mL ずつ流し、分画試験を行った。DDVP-*d*₆の回収率を図 12 に示す。DDVP-*d*₆はアセトニトリル 0 ～4 mL でほとんど溶出し、4～6 mL では検出されなかった。このことから、環境試料を前処理する際は、余裕をもってアセトニトリル 6 mL で溶出することとした。

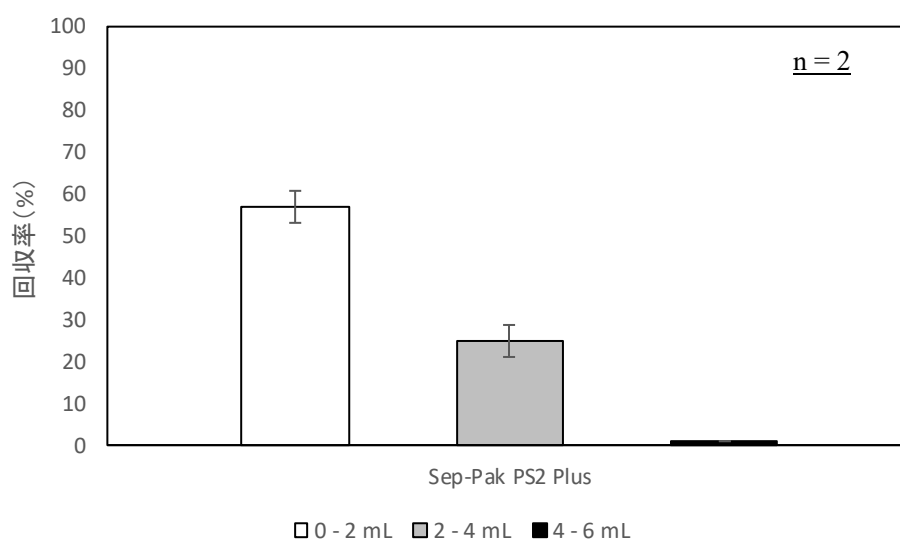


図 12 Sep-Pak PS2 Plus を用いたサロゲート内標準物質(DDVP-*d*₆)の分画試験結果

〔環境試料の分析〕

本分析法を用いて福岡県の河川水（雷山川）及び海水（大牟田沖）を分析した結果、りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニルはいずれも検出されなかった（前述の図 9-1 及び図 9-3）。

【評価】

環境水中に含まれるりん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル(DDVP)の分析法を開発した。本分析法で用いた LC/MS/MS の IDL は 0.60 pg (IDL 試料換算値 0.00030 µg/L) であった。検量線は 0.50～100 ng/mL の濃度範囲で直線性が確認された。環境試料を用いた添加回収試験結果は、河川水 96%（サロゲート回収率 84%）、海水 95%（サロゲート回収率 93%）であった。MDL は河川水 0.00039 µg/L、海水 0.00043 µg/L であった。なお、河川水及び海水からは当該物質は検出されなかった。

以上の結果から、本分析法は環境水中の DDVP について 0.0004 µg/L レベルの定量に適用可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) Chapman R. A., Cole C. M.: Observations on the influence of water and soil pH on the persistence of insecticides. *J. Environ. Sci. Health. B.*, **17**, 487-504 (1982)

【担当者連絡先】

所属機関名 : 福岡県保健環境研究所

所属先住所 : 〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野 39

TEL 092-921-9943

FAX 092-928-1203

担当者氏名 : 酒谷 圭一

E-mail : sakatani@fihes.pref.fukuoka.jp

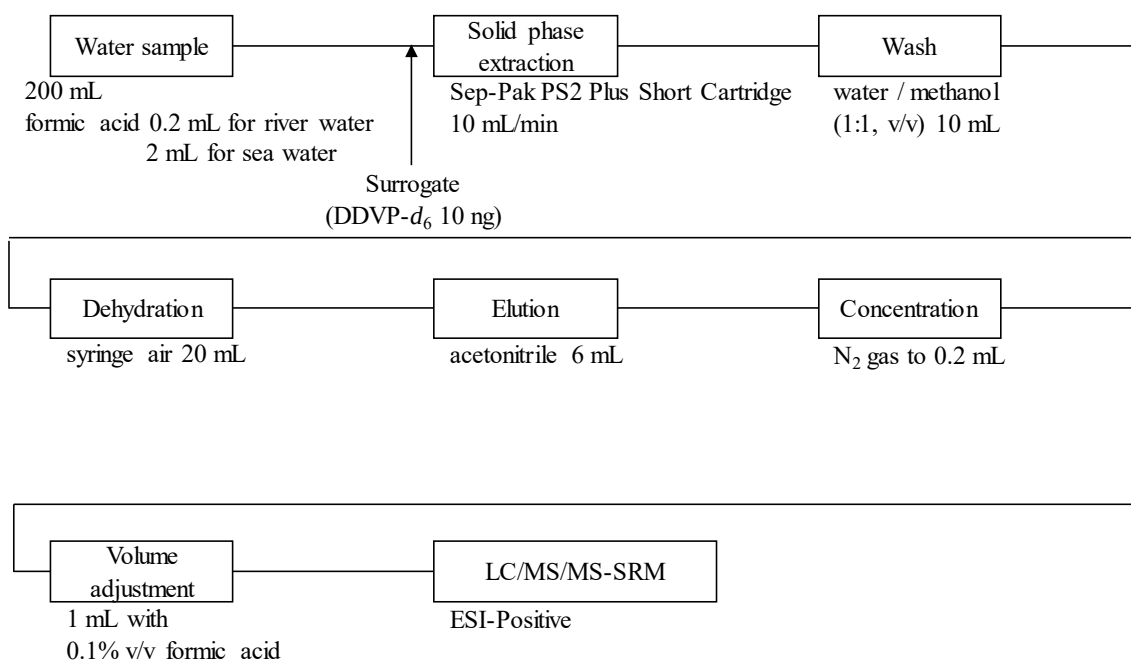
Dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate

This method provides a procedure for the determination of dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

Formic acid is added to 200 mL of a water sample, followed by 10 ng of DDVP-*d*₆. The water sample is passed through a solid-phase extraction cartridge (Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge, pre-conditioned with 10 mL of methanol and 10 mL of purified water) at a flow rate of 10 mL/min. The cartridge is washed with 10 mL of water-methanol (1:1, v/v) and then dehydrated before elution with 6 mL of acetonitrile. The eluate is concentrated to 0.2 mL under a flow of nitrogen, and adjusted to 1 mL with 0.1% v/v formic acid for LC/MS/MS-SRM analysis.

The instrument detection limit (IDL) is 0.60 pg. The method detection limit (MDL) of DDVP in river water and seawater are 0.00039 µg/L and 0.00043 µg/L, respectively. The average recoveries from samples spiked with 5.0 ng of DDVP were 96% from river water and 95% from seawater with relative standard deviations of 3.4% and 2.4%, respectively.

River and bay surface-water samples were taken in Fukuoka prefecture. The concentrations of DDVP in river water and bay surface-water samples were below the MDLs.



物質名	分析法フローチャート	備考
りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル(DDVP)	【水質】 <pre> graph TD A["水質試料 200 mL 酢酸 0.2 mL (河川水) 2 mL (海水)"] -- "サロゲート添加 (DDVP-d₆ 10 ng)" --> B["固相抽出 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge 10 mL/min"] B --> C["洗浄 精製水/メタノール(1:1) 溶液 10 mL"] C --> D["脱水 空気 20 mL"] D --> E["溶出 アセトニトリル 6 mL"] E --> F["濃縮 窒素気流下 0.2 mL"] F --> G["定容 0.1% 酢酸 1 mLに"] G --> H["LC/MS/MS-SRM ESI-Positive"] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive) 検出下限値： 【水質】(μg/L) 0.00039 (河川水) 0.00043 (海水) 分析条件： 機器 LC：島津製作所 製 Nexera X2 MS：島津製作所 製 LCMS-8050 カラム Xbridge C18 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)