

1, 4-ジオキサン分析法に関する検討

化学部
大森 牧子 高橋 直人 添野 忠宏 高橋 稔 桐原 広成

1 はじめに

1, 4-ジオキサンの地下水環境基準や排水基準に係る測定方法は、昭和46年環境省告示59号付表8（以下、「告示付表」という。）に活性炭抽出-GC/MS法、ページ・トラップ-GC/MS法、ヘッドスペース-GC/MS法（以下、それぞれ「固相抽出法」、「PT法」、「HS法」という。）が示されている。当所では、1, 4-ジオキサンが平成21年に環境基準項目へ追加された際、当時使用していたHS-GC/MSでHS法を試したが、基準値の1/10である定量下限値5μg/Lを得ることができなかったため、固相抽出法を採用してきた。この固相抽出法では、サロゲート回収率と保持時間について許容範囲が示されており、今般、サロゲート回収率等のばらつきを検討する機会を得たので、その結果を報告する。

2 方法

2.1 試薬

- 標準品
測定対象：1, 4-ジオキサン標準品 1000mg/L メタノール溶液 関東化学株式会社製
サロゲート：1, 4-ジオキサン-d8 標準品 1000mg/L メタノール溶液 関東化学株式会社製
内部標準液：*p*-ブロモフルオロベンゼン 1mg/mL メタノール溶液 関東化学株式会社製
- 溶媒等
アセトン 300：残留農薬試験用 関東化学株式会社製
メタノール：特級 富士フィルム和光純薬株式会社製
Autoprep MF-2：Resonac 株式会社製

2.2 装置及び器具

- 固相カートリッジ型活性炭カラム：Waters 製 Sep-Pac Plus AC-2（以下、「固相 AC-2」という。）
- カートリッジ型ポリスチレン充填カラム：Waters 製 Sep-Pac Plus PS-2（以下、「固相 PS-2」という。）
- 固相抽出装置：Waters 社製 Concentrator
- 遠心分離機：コクサン社製 H-80F
- 高速窒素濃縮装置：Thermo 社製 Reacti-Therm
- 窒素吹付け濃縮装置：Biotage 社製 TurboVap
- ガスクロマトグラフ質量分析計
島津製作所製 GCMS-QP2020 NX（以下、「島津 GC/MS」という。）
アジレント社製 Agilent 5977A GC/MS（以下、「Agilent GC/MS」という。）

2.3 分析方法

告示付表に従い、図1の工程で次のとおり行った。
アセトン20mL及び水40mLでコンディショニングした固相 AC-2 の前段に、アセトン10mL及び水10mLでコンディショニングした固相 PS-2 を連結し、試料200mLを10mL/minで通水した。その後、固相 AC-2 を遠心分離機で3000rpm×20min脱水後、窒素を通気して乾燥させた。固相 AC-2 からアセトン2mLで1, 4-ジオキサン及び1, 4-ジオキサン-d8（以下、「測定対象物」という。）を溶出させ、窒素吹きつけ濃縮装置で濃縮後1mLに定容し、内部標準液を添加し GC/MS の試料溶液とした。この溶液を GC/MS に2μL 注入し測定した。

2.4 測定条件

- キャピラリーカラム
SHIMADZU SH-Stabilwax (L:30m, ID:0.25mm, DF:0.25μm)
Agilent DB-WAX (L:30m, ID:0.25mm, DF:0.25μm)

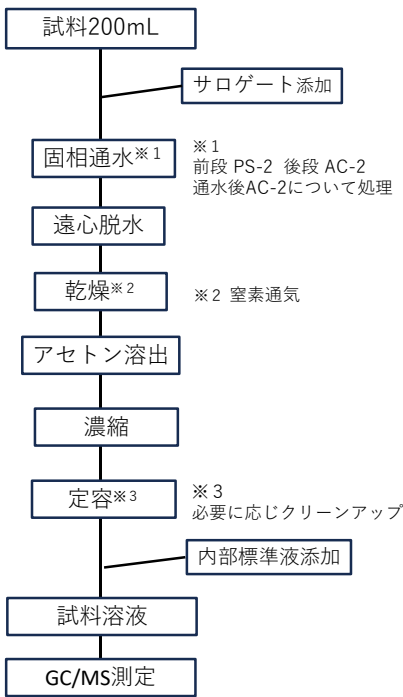


図1 分析工程

- ・ 注入口温度及び注入方法
250℃, スプリットレス, サンプルング時間 2 分
- ・ 昇温条件
40℃ (5min) → 10℃/min → 230℃ (7min)
- ・ MS
インターフェース温度 250℃, イオン源温度 230℃
- ・ イオン化電圧
70V

3 課題

3.1 課題の詳細

表 1 のとおり、手順書をもとに予備試験（併行試験 n=6）を実施したところ、サロゲート回収率が 40～90%と安定せず(CV32%)、告示付表の許容範囲の下限値である 50%を下回った。また、表 2 のとおり添加回収試料の保持時間及び強度比が告示付表の許容範囲を逸脱したものについて、Autoprep MF-2 でクリーンアップしたが、試料で図 2 のとおりピーク形状の悪化や割れが生じ改善しなかった。

表 1 サロゲート回収率

N	Sr/IS (%)
1	86
2	41
3	61
4	45
5	90
6	50
最大	90
最小	41
平均	62
標準偏差	20
CV%	32

Sr: サロゲート IS: 内部標準

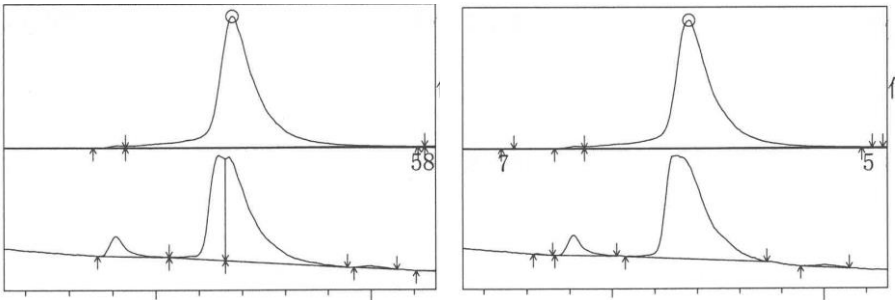


図 2 同一試料(添加回収)を繰返し測定したクロマトグラム (m/z 上:88 下:58)

表 2 保持時間や強度比の許容範囲の逸脱

試料		保持時間 (min)		応答値		強度比 (定量イオン/確認イオン)		
		平均	許容範囲※1	定量イオン(88)	確認イオン(58)	強度比	平均	許容範囲※2
STD1 (1mg/L)	6.525	6.537	最小 6.454 最大 6.620	130227	97358	1.3376	1.3078	最小 1.0463 最大 1.5694
STD2 (2mg/L)	6.528			263605	202018	1.3049		
STD3 (3mg/L)	6.539			385512	300993	1.2808		
STD4 (4mg/L)	6.544			505832	389301	1.2993		
STD5 (5mg/L)	6.548			632768	480591	1.3166		
添加回収	6.654	保持時間の許容範囲外※1		100785	54620	1.8452	強度比の許容範囲外※2	
添加回収	6.342	保持時間の許容範囲外※1		85842	47038	1.8250	強度比の許容範囲外※2	

※1 告示付表の許容範囲 保持時間: STD 保持時間の±5秒以内に出現 ※2 告示付表の許容範囲 強度比: STD 強度比±20%以内で一致

3.2 課題の整理

前述の課題に言及し考察している報告¹⁾²⁾³⁾⁴⁾等から、課題を次の6つの観点に整理した。分析操作に関しては回収率向上と再現性を重視し、ピーク形状や強度比については、GCの測定環境を整えて課題を解消していくこととした。

- ① 測定対象物の添加における混和
- ② 固相 AC-2 からの溶出液を濃縮する際の測定対象物の揮発
- ③ 溶媒を固相の孔に浸潤させる固相コンディショニング方法及び測定対象物の固相吸着効率の向上
- ④ 通水後の測定対象物を吸着させた固相 AC-2 の脱水

- ⑤ 試料溶液のメタノール濃度の影響
- ⑥ 測定対象物の試料溶液への馴化

4 結果及び考察

3.2 の課題について段階的に検討し順次手順書に反映していった。結果詳細は後述するが、概要は表 3 のとおり。

表 3 検討課題及び結果概要

検討順	課題	結果（手順書への反映事項）
①	添加混和方法	4.1.1 添加後に超音波で混和
②	濃縮する際の揮発	4.1.2 25℃×8min 濃縮→省略・定容量 1mL→2mL
③	固相のコンディショニング 吸着効率の向上・通水速度	4.1.3 ゆっくり浸潤・1 滴/秒 通水速度 10mL/min→7mL/min
		4.1.4 コンディショニング後の固相を水充填一晚放置
④	通水後の固相の脱水	4.1.4 遠心脱水 3000rpm×20min→10min・N ₂ 通気 30min→1H
⑤	試料溶液のメタノール濃度の影響	4.1.5 サロゲート溶液はメタノール希釈（変更なし）
⑥	測定対象物の試料溶液への馴化	4.1.4 及び 4.1.6 添加後一晚冷所保存
GC 測定条件	ピーク形状の悪化・保持時間の変動	注入量 2μL→1μL・キャピラリーカラム更新

4.1 測定対象物の回収率向上に向けた検討

4.1.1 添加混和方法

中越ら⁴⁾は、1,4-ジオキサンを水に溶解しにくい気体にあてはめるヘンリーの法則で説明し、VOC の中では水中から大気への移行速度が遅いとしている。また、告示付表で添加回収試料に添加混和後 60 分放置するとしていることから、水に馴染ませる混和の方法を検討した。

攪拌子による混和と超音波をそれぞれ 1 分かけて比較した結果、攪拌子 79%、超音波 84%と、超音波で混和させた方が良好な回収率であった。

4.1.2 濃縮する際の揮発 表 4-②

告示付表に GC/MS の感度が得られる場合は濃縮を必須としないとなり、GC/MS の感度が十分であったことから、固相からアセトン 2mL で溶出した後の測定試料を濃縮する工程を省き 2mL に定容とした。その結果、表 4 の②のとおり 78～96%で、平均 86%、CV も 6.3%と改善した。

当所の手順書では「25℃の水浴にスピッツ管を浸け、液面がわずかに揺れる程度の通気」と記載していたが、窒素吹付け濃縮装置には水浴を 25℃に制御する冷却機能がなく、特に夏季は室温で濃縮する状況となるため、濃縮操作は SCAN 分析で同定する場合など必要に応じ実施することとした。

4.1.3 固相のコンディショニング・吸着効率の向上・通水速度 表 4-③

安部ら¹⁾は、サロゲート添加—内部標準法は分析における感度補正に有効としつつ、固相は個体差があり、通水時のコンディショニング及び脱離液量の誤差等を反映したばらつきを指摘している。

そこで、固相のばらつきを抑える具体策について情報収集した。固相メーカーのジーエルサイエンス株式会社から、「コンディショニングにおいて、初めに溶媒を充填するときにはゆっくり浸潤させるようにする。5 分保持し、後に一秒一滴で洗う」との助言を得て実践することとした。実際の溶出速度は、一滴を 0.02mL とすると約 1mL/min と見積もることができ、安部ら¹⁾と同等の速度となる。併せて、通水速度は、神野ら²⁾の報告を参考に 10mL/min を 7mL/min と遅くして固相の吸着効率の向上を図った。その結果は表 4 の③のとおりいずれも 80%を超え安定した。

4.1.4 通水後の固相の脱水 表 4-③～⑥

通水後の固相の水分子除去について、神野ら²⁾は、吸引乾燥を 10 分以上行くと 1,4-ジオキサンの回収率が低下すると報告しているが、北ら³⁾は遠心脱水 2000rpm×30min を推奨しつつ不完全とし、窒素通気 20 分で完全に水分を除去

表 4 サロゲート回収率 (Sr/IS)

課題 N	②	③	③～⑥
1	78	81	96
2	85	88	96
3	82	85	103
4	87	86	94
5	89	88	95
6	96	97	97
最大	96	97	103
最小	78	81	94
平均	86	88	97
標準偏差	5.4	5.3	3.2
CV%	6.3	6.1	3.3

できたと報告している。親水性物質溶液を極性カラムでGC測定する際は水分を残さないようにする必要があるため、遠心脱水と窒素通気を組み合わせ、遠心時間を20分から10分に、窒素通気は、吹出口に薄紙をあてて塞がらない程度までガス量を絞り、30分から1時間に延長した。

また、測定対象物の添加は前日に行い一晩冷所保存とし、固相AC-2は、抽出前日にコンディショニングし水で充填しておいたものを使用した。その結果は、表4の③～⑥のとおり94～103%で平均97%、CVも3.3%となった。

4.1.5 試料溶液のメタノール濃度の影響

告示付表は、測定対象の1,4-ジオキサン標準液はメタノールで希釈するが、サロゲートはメタノール溶液の原液を水で希釈し10%メタノール溶液として全試料に添加する。つまり、1,4-ジオキサン標準液とサロゲート溶液の溶媒組成が異なっている。

そこで、試料溶液のメタノール濃度がサロゲート回収率に影響を与えていないか確認した。

その結果は表5の当日添加に示すとおり、水希釈のサロゲート回収率(Sr/IS)が68%のところ、メタノール希釈Aのサロゲート回収率(Sr/IS)は83%と15%高かった。また、1,4-ジオキサンについても内部標準に対する値(Tg/IS)を計算したところ、表6の当日添加のとおり、水希釈のサロゲート添加の値(Sr/IS)は65%、メタノール希釈のサロゲート溶液のそれ(Tg/IS)は77%と12%高かった。1,4-ジオキサンとサロゲートの挙動は、Tg/Srが96及び93%とほぼ等しく、試料溶液のメタノール濃度が両方の回収率向上に影響している可能性が示唆された。

添加回収試料200mL中のメタノール量は、1,4-ジオキサンの標準液由来の200μLに加え、水希釈ではサロゲート溶液由来の2μL、メタノール希釈Aではサロゲート溶液由来の20μLであり、メタノール濃度としては0.101%及び0.11%とほとんど差がない。そこで、メタノール希釈Bとしてメタノール濃度0.2%も試したが、サロゲート回収率(Sr/IS)は78%、1,4-ジオキサン(Tg/IS)も77%にとどまった。

4.1.6 測定対象物の試料溶液への馴化

1,4-ジオキサン分析において、サロゲートは測定対象物の1,4-ジオキサンと同じ挙動をとり、サロゲート回収率(Sr/IS)が分析を評価する指標となっている。そこで、サロゲート回収率(Sr/IS)をさらに向上させる策として、抽出当日に添加し60分放置したものと、前日に添加して一晩冷蔵保存したものを比較した。

サロゲート(メタノール希釈A)(Sr/IS)は表5のとおり当日添加は83%、前日添加したものは99%であった。1,4-ジオキサン(Tg/IS)は、表6のとおり、当日添加が77%のところ前日添加が97%であり、いずれも前日に添加し一晩放置したものが良い回収率であった。添加後に馴化させる時間を確保することで回収率は向上した。

表5 サロゲート(1,4-ジオキサン-d8)の回収率(%) Sr/IS

添加溶液	メタノール濃度	当日添加	前日添加	平均
100mg/L×20μL 水希釈(10%メタノール)	0.101%	68	84	76
100mg/L×20μL メタノール希釈 A	0.110%	83	99	91
10mg/L×200μL メタノール希釈 B	0.2%	78		
平均		76	92	

表6 1,4-ジオキサンの回収率(%) Tg/IS(Tg/Sr×Sr/IS)

添加溶液	メタノール濃度	当日添加	前日添加	平均
100mg/L×20μL 水希釈(10%メタノール)	0.101%	65 (96×0.68)	83 (99×0.84)	74
100mg/L×20μL メタノール希釈 A	0.110%	77 (93×0.83)	97 (98×0.99)	87
10mg/L×200μL メタノール希釈 B	0.2%	77 (99)		
平均		73 (95)	90 (98)	

4.2 GC 測定条件の検討

4.2.1 機器調整及びGC注入量

従前から、標準液と試料溶液の保持時間の差が5秒以上となることがあり、測定機器(島津GC/MS)の特性により試料中の水分が影響していると考えていた。安部¹⁾はHP6890GC-Agilent 5972A型MSを使用し、水分が残っているとピークが割れる等、形状が悪くなると報告し、北³⁾は、当所と同型機を使用し、水分の影響は注入法をスプリットに変更することで改善できると報告している。

そこで、注入口の汚れを疑い、インサートを交換し、キャピラリーカラムの注入側の先端を切断するなど、改めて測定機器の調整を行った上で、アセトンで希釈した標準液をスプリットレス測定のまま、1μLと2μL注入を交互に繰り返したところ、保持時間もそれに呼応して変動し表7中段のとおりとなった。下欄に標準液と添加回収試料を1μL

注入し繰り返し測定した結果を示したが、添加回収試料の保持時間は告示付表の許容範囲(STD の保持時間の±5 秒以内)に入った。

今回、注入量を半分にし、測定機器への負荷を軽減させたが、添加回収試料は保持時間が遅れる傾向にあった。

表 7 注入量の違い及びカラム切断等の機器調整前後の保持時間

試料	機器調整 カラム切断	注入量	保持時間(min)		強度比 (定量イオン/確認イオン)	
			平均	許容範囲	88/58	96/64
標準液	前	2μL	6.55	6.47~6.63	1.4	1.1
添加回収		2μL	6.68		1.7	1.2
標準液	後	2μL	6.18	6.10~6.27	1.3	1.1
標準液		1μL	5.88	5.80~5.96	1.4	1.1
標準液	後	1μL	5.97	5.89~6.05	1.4	1.1
添加回収		1μL	6.01		1.5	1.3

4.2.2 ピーク形状の悪化や割れ

今回、測定を繰り返すと図 2 に示すピーク形状の悪化や割れが生じるようになった。カラムを更新し、Agilent GC/MS で同じ試料を測定したところ、ピーク形状の悪化や割れは全く見られなくなった。今回のピーク割れは、キャピラリーカラムの劣化が主な要因であったと考えられた。

5 まとめ

5.1 測定対象物の回収率向上に向けた検討

窒素吹きつけによる濃縮操作を省略した結果、ばらつきを抑えることができたことから、この工程で測定対象物の揮発があり、サロゲート回収率がばらついたと考えられた。加えて、固相の抽出機能が十分発揮するようコンディショニングを抽出前日に行い、サロゲート添加後、試料溶液に馴化させる時間を確保することで、最終的に平均回収率が 97%、ばらつき (CV%) が 3.3%と改善した。

メタノールは固相吸着に影響を与えている可能性が示唆された。再現性良く良好な回収率を得る最適なメタノール量の検討は今後の課題とし、測定対象物を前日に添加し馴化時間を確保することで回収率が向上したことから、この手法で再現性向上の可能性が示唆された。

5.2 GC 測定条件の検討

保持時間の変動や強度比は注入量を減らしたところ改善し、ピーク割れもカラムの更新で改善した。このような現象はキャピラリーカラムの劣化が原因となっている可能性が高く、キャピラリーカラムの交換の目安と考えられた。

5.3 固相抽出法と PT 法・HS 法

当所では告示改正当初から、1,4-ジオキサンについて固相抽出法を採用してきたが、サロゲートと内部標準を併用し高極性カラムを用いる細部に注意を要する分析法であるため、疑問を抱えつつも課題解決の観点を絞れずにいた。今回、手順書の子細な部分を検討することによって固相抽出法の操作の意義を確認し、それを裏付けるデータを得ることができた。

今後、今回の 1,4-ジオキサンの挙動を把握した経験を踏まえ、PT 法や HS 法についても固相抽出法と同等の精度が得られるか検討していく。

6 参考文献

1) 安部明美、固相抽出—GC/MS による 1,4-ジオキサンの分析法と環境水への適用、環境科学、vol.7、No1、95-100、1997。
2) 神野憲一他、活性炭カーリッジを用いる固相抽出—ガスクロマトグラフィー/質量分析法による河川水中の親水性有機化合物の定量、分析化学、vol.56、No.12、1141-1146、2007。
3) 北直子他、1,4-ジオキサン分析における固相カートリッジの遠心分離脱水について、福岡県保健環境研究所年報、第38号、97-100、2011。
4) 中越章博他、ヘッドスペース-GC/MS 法による 1,4-ジオキサンの分析について、兵庫県環境研究センター紀要、財団法人ひょうご環境創造協会、13-16、vol.2、2011。