

測定手法の最適化による  
水道水質検査方法の測定精度の改善  
—非イオン界面活性剤とクロルニトロフェンに対して—

Improvement of measurement accuracy of tap water quality  
analytical method for nonionic surfactant and chlornitrofen  
by optimization of measurement technique

2020年9月

岐阜大学大学院 工学研究科  
生産開発システム工学専攻

岩間 紀知



# 目次

## 第1章 序論

1.1 研究背景	1
1.2 水道法と水質基準	1
1.3 水質検査の実施頻度と実施体制	6
1.4 水質検査法	8
1.5 妥当性評価の基準	14
1.6 本研究の目的と内容	14
1.7 本論文の構成	15

## 第2章 非イオン界面活性剤（NIS）の物性と試験法原理

2.1 はじめに	17
2.2 界面活性剤の種類と水環境動態	17
2.3 NISの水質基準値と設定背景	21
2.4 NISの検査法と検出原理	22
2.5 Co-NCS法の概要	24
2.6 PAR法の概要	27

## 第3章 錯形成反応の最適化による水道水中NIS告示法の測定精度の改善

3.1 はじめに	31
3.2 実験方法	32
3.2.1 試薬と器具	32
3.2.2 錯形成条件の検討方法	33
3.3 結果及び考察	36
3.3.1 Co-NCS法の錯形成条件の検討	36
3.3.2 PAR法の錯形成条件の検討	39

3.3.3	固相抽出に用いる容器の材質と容器洗い込み方法の検討	41
3.3.4	水道水添加回収試験と妥当性評価	42
3.3.5	水道原水添加回収試験	45
3.4	まとめ	47
<b>第4章 クロロニトロフェン（CNP）及びCNP-アミノ体の物性と試験法原理</b>		
4.1	はじめに	49
4.2	CNPの物性と環境動態	49
4.3	CNPの水質管理目標値と設定背景	51
4.4	CNP公定法の概要	51
4.5	質量分析法の概要	51
4.5.1	はじめに	51
4.5.2	ガスクロマトグラフィー	52
4.5.3	液体クロマトグラフィー	54
4.5.4	質量分析法の原理と特徴	57
<b>第5章 固相抽出-LC-APCI-MS/MSによる水道水中のCNP及びCNP-アミノ体の測定手法の検討</b>		
5.1	はじめに	63
5.2	実験方法	64
5.2.1	試薬と標準液	64
5.2.2	LC-MS/MS測定条件の検討	64
5.2.3	試験操作法	65
5.2.4	固相抽出時の容器洗い込み方法の検討	66
5.2.5	水道水添加回収試験と妥当性評価	66
5.3	結果及び考察	66
5.3.1	LC-MS/MS測定条件の検討	66
5.3.2	固相抽出時の容器洗い込み方法の検討	73

5.3.3 水道水添加回収試験と妥当性評価 .....	74
5.4 まとめ .....	75
<b>第6章 総括</b>	
6.1 本研究のまとめ .....	77
6.2 今後の展望 .....	78
参考文献 .....	79
研究業績 .....	86
謝辞 .....	87



# 第1章 序論

## 1.1 研究背景

人間の体の約 60%は水分であり、その維持のため、飲み水や食品などからの摂取量として1日当たり約2Lの水が必要とされている。また、水は飲用用途以外にも、生活用水、工業用水、農業用水などの用途として必要不可欠である。人口が集積し、都市が形成されるためには、これら人口をまかなえる十分量の水を供給する必要性があるが、近代の水道においては、十分な水量を確保するという役割だけでなく、水質という観点から安全な水を造り供給するということも、大きな役割のひとつとなっている<sup>1)</sup>。

## 1.2 水道法と水質基準

日本の水道水質管理に直接関係する法令としては、水道法<sup>2)</sup>と、これに基づいて定められる施行令、施行規則、水質基準<sup>3)</sup>、水道施設の技術的基準及び給水装置の構造及び材質の基準が挙げられる。水道の水質基準 (DWQs: Drinking Water Quality Standards) は、人の健康の保護と生活利用上の要請の両面からの検討に基づいて設定されている。その他にも、水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目<sup>4)</sup>が、さらに、現段階では毒性について十分な知見が無い、水道水中での検出状況が明らかでないなどの理由で、水質基準や水質管理目標設定項目に分類できなかった項目として要検討項目<sup>5)</sup>が設定されている。これら各項目の概要と相互関係<sup>6)</sup>を Fig. 1-1 に、また各項目の内容を Table 1-1～Table 1-3 に示す。

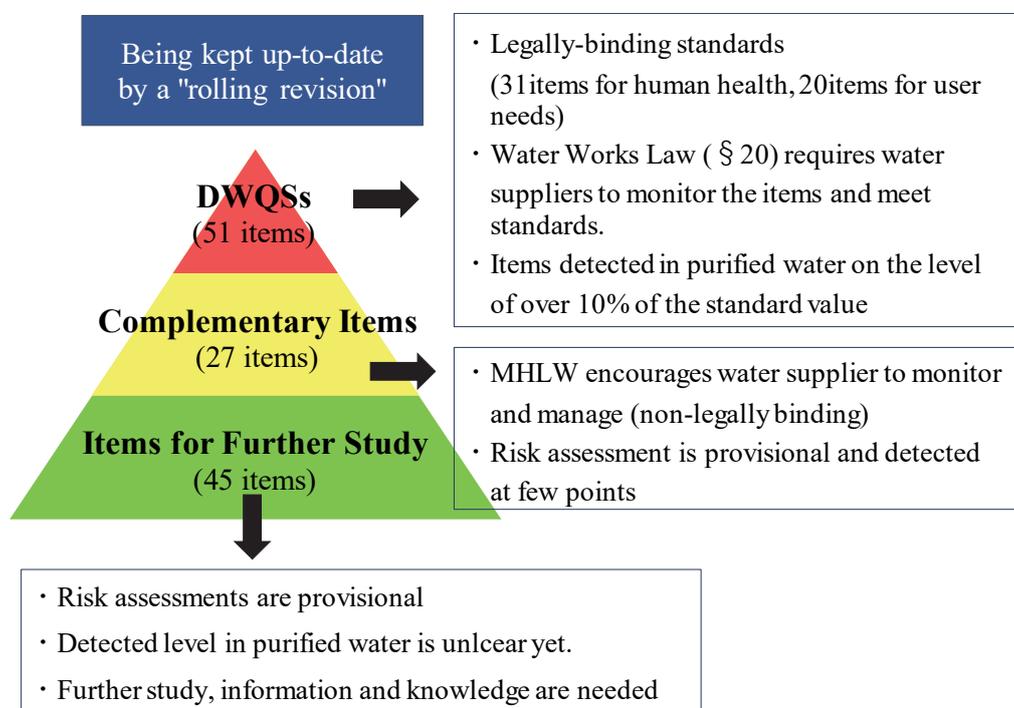


Fig. 1-1 Scheme of Drinking Water Quality Control<sup>6)</sup>

Table 1-1 Drinking Water Quality Standards in Japan

No.	Items	Standard Value
1	Common Bacteria	100 per 1 mL
2	E. coli	Not to be detected
3	Cadmium	0.003 mg/L
4	Mercury	0.0005 mg/L
5	Selenium	0.01 mg/L
6	Lead	0.01 mg/L
7	Arsenic	0.01 mg/L
8	Chromium (VI)	0.02 mg/L
9	Nitrite nitrogen	0.04 mg/L
10	Cyanide ion and Cyanogens chloride	0.01 mg/L
11	Nitrate and Nitrite	10 mg/L
12	Fluoride	0.8 mg/L
13	Boron	1.0 mg/L
14	Carbon tetrachloride	0.002 mg/L
15	1,4-dioxane	0.05 mg/L
16	cis-1,2-Dichloroethylene and trans-1,2- Dichloroethylene	0.04 mg/L
17	Dichloromethane	0.02 mg/L
18	Tetrachloroethylene	0.01 mg/L
19	Trichloroethylene	0.01 mg/L
20	Benzene	0.01 mg/L
21	Chlorate	0.6 mg/L
22	Chloroacetic acid	0.02 mg/L
23	Chloroform	0.06 mg/L
24	Dichloroacetic acid	0.03 mg/L
25	Dibromochloromethane	0.1 mg/L
26	Bromate	0.01 mg/L
27	Total trihalomethanes (Total of Chloroform, Dibromochloromethane, Bromodichloromethane and Bromoform)	0.1 mg/L
28	Trichloroacetic acid	0.03 mg/L
29	Bromodichloromethane	0.03 mg/L
30	Bromoform	0.09 mg/L
31	Formaldehyde	0.08 mg/L
32	Zinc	1.0 mg/L
33	Aluminium	0.2 mg/L
34	Iron	0.3 mg/L
35	Copper	1.0 mg/L
36	Sodium	200 mg/L
37	Manganese	0.05 mg/L
38	Chloride ion	200 mg/L
39	Calcium, Magnesium (Hardness)	300 mg/L
40	Total residue	500 mg/L
41	Anionic surface active agent	0.2 mg/L
42	(4S, 4aS, 8aR)-Octahydro-4,8a-Dimethylenaphtalene-4a(2H)-ol (Alias: Geosmin)	0.00001 mg/L
43	1,2,7,7 - Tetramethylbicyclo[2,2,1]Heptane-2-ol (Alias: 2-Methylisobolneol)	0.00001 mg/L
44	Nonionic surface active agent	0.02 mg/L
45	Phenols	0.005 mg/L in terms of Phenol
46	Organic substances (Total Organic Carbon)	3 mg/L
47	pH Value	5.8 ~ 8.6
48	Taste	Not abnormal
49	Odor	Not abnormal
50	Color	5 degree
51	Turbidity	2 degree

Table 1-2 Complementary Items

No.	Items	Target Value
1	Antimony	0.02 mg/L
2	Uranium	0.002 mg/L(P)
3	Nickel	0.02 mg/L
4	1,2-dichloroethane	0.004 mg/L
5	Toluene	0.4 mg/L
6	Diethylexyl phthalate	0.08 mg/L
7	Chlorite	0.6 mg/L
8	Chlorine dioxide	0.6 mg/L
9	Dichloroacetonitrile	0.01 mg/L(P)
10	Chlorate hydrate	0.02 mg/L(P)
11	Pesticides	1
12	Chlorine residue	1 mg/L
13	Calcium, Magnesium (Hardness)	10-100 mg/L
14	Manganese	0.01 mg/L
15	Free carbon dioxide	20 mg/L
16	1,1,1-Trichloroethane	0.3 mg/L
17	Methyl-t-butylether (MTBE)	0.02 mg/L
18	Organic substances (Potassium permanganate consumption)	3 mg/L
19	Threshold Odor Number	3 TON
20	Total residue	30-200 mg/L
21	Turbidity	1 degree
22	pH Value	Approx.7.5
23	Causticity (Langelier's Index)	-1 ~ 0
24	heterotrophic bacteria	2000 per 1 mL(P)
25	1,1-Dichloroethylene	0.1 mg/L
26	Aluminium	0.1 mg/L
27	PFOS and PFOA	0.00005 mg/L(P)

Table 1-3 Pesticides of Complementary Items

No.	Items	Target Value	No.	Items	Target Value
1	1,3-Dichloropropene (D-D)	0.05 mg/L	58	Thiodicarb	0.08 mg/L
2	2, 2-DPA (Dalapon)	0.08 mg/L	59	Thiophanate-methyl	0.3 mg/L
3	2, 4-D (2, 4-PA)	0.02 mg/L	60	Thiobencarb	0.02 mg/L
4	EPN	0.004 mg/L	61	Tefuryltrione	0.002 mg/L
5	MCPA	0.005 mg/L	62	Terbucarb (MBPMC)	0.02 mg/L
6	Asulam	0.9 mg/L	63	Triclopyr	0.006 mg/L
7	Acephate	0.006 mg/L	64	Trichlorfon (DEP)	0.005 mg/L
8	Atrazine	0.01 mg/L	65	Tricyclazole	0.1 mg/L
9	Anilofos	0.003 mg/L	66	Trifluralin	0.06 mg/L
10	Amitraz	0.006 mg/L	67	Napropamide	0.03 mg/L
11	Alachlor	0.03 mg/L	68	Paraquat	0.005 mg/L
12	Isoxathion	0.005 mg/L	69	Piperophos	0.0009 mg/L
13	Isofenphos	0.001 mg/L	70	Pyraclonil	0.01 mg/L
14	Isoproc carb (MIPC)	0.01 mg/L	71	Pyrazoxyfen	0.004 mg/L
15	Isoprothiolane (IPT)	0.3 mg/L	72	Pyrazolynate	0.02 mg/L
16	Iprobenfos (IBP)	0.09 mg/L	73	Pyridaphenthion	0.002 mg/L
17	Iminoctadine	0.006 mg/L	74	Pyributicarb	0.02 mg/L
18	Indanofan	0.009 mg/L	75	Pyroquilon	0.05 mg/L
19	Esprocarb	0.03 mg/L	76	Fipronil	0.0005 mg/L
20	Etofenprox	0.08 mg/L	77	Fenitrothion (MEP)	0.01 mg/L
21	Endosulfan	0.01 mg/L	78	Fenobucarb (BPMC)	0.03 mg/L
22	Oxaziclomefone	0.02 mg/L	79	Ferimzone	0.05 mg/L
23	Oxine-copper	0.03 mg/L	80	Fenthion (MPP)	0.006 mg/L
24	Oryastrobin	0.1 mg/L	81	Phenthoate (PAP)	0.007 mg/L
25	Cadusafos	0.0006 mg/L	82	Fentrazamide	0.01 mg/L
26	Cafenstrole	0.008 mg/L	83	Fthalide	0.1 mg/L
27	Cartap	0.08 mg/L	84	Butachlor	0.03 mg/L
28	Carbaryl (NAC)	0.02 mg/L	85	Butamifos	0.02 mg/L
29	Carbofuran	0.005 mg/L	86	Buprofezin	0.02 mg/L
30	Quinoclammin (ACN)	0.005 mg/L	87	Fluazinam	0.03 mg/L
31	Captan	0.3 mg/L	88	Pretilachlor	0.05 mg/L
32	Cumyluron	0.03 mg/L	89	Procymidone	0.09 mg/L
33	Glyphosate	2 mg/L	90	Prothiophos	0.007 mg/L
34	Glufosinate	0.02 mg/L	91	Propiconazole	0.05 mg/L
35	Clomeprop	0.02 mg/L	92	Propyzamide	0.05 mg/L
36	Chloronitrofen (CNP)	0.0001 mg/L	93	Probenazole	0.03 mg/L
37	Chlorpyrifos	0.003 mg/L	94	Bromobutide	0.1 mg/L
38	Chlorothalonil (TPN)	0.05 mg/L	95	Benomyl	0.02 mg/L
39	Cyanazine	0.001 mg/L	96	Pencycuron	0.1 mg/L
40	Cyanophos (CYAP)	0.003 mg/L	97	Benzobicyclon	0.09 mg/L
41	Diuron (DCMU)	0.02 mg/L	98	Benzofenap	0.005 mg/L
42	Dichlobenil (DBN)	0.03 mg/L	99	Bentazon	0.2 mg/L
43	Dichlorvos (DDVP)	0.008 mg/L	100	Pendimethalin	0.3 mg/L
44	Diquat	0.01 mg/L	101	Benfuracarb	0.04 mg/L
45	Disulfoton (Ethylthiometon)	0.004 mg/L	102	Benfluralin (Bethrodine)	0.01 mg/L
46	Dithiocarbamate Fungicides	0.005 mg/L (as CS2)	103	Benfuresate	0.07 mg/L
47	Dithiopyr	0.009 mg/L	104	Fosthiazate	0.003 mg/L
48	Cyhalofop-butyl	0.006 mg/L	105	Malathion (Malathon)	0.7 mg/L
49	Simazine (CAT)	0.003 mg/L	106	Mecoprop (MCP)	0.05 mg/L
50	Dimethametryn	0.02 mg/L	107	Methomyl	0.03 mg/L
51	Dimethoate	0.05 mg/L	108	Metalaxyl	0.2 mg/L
52	Simetryn	0.03 mg/L	109	Methidathion (DMTP)	0.004 mg/L
53	Diazinon	0.003 mg/L	110	Metominostrobin	0.04 mg/L
54	Dymron	0.8 mg/L	111	Metribuzin	0.03 mg/L
55	Dazomet, Metham and Methyl isothiocyanate (MITC)	0.01 mg/L (as MITC)	112	Mefenacet	0.02 mg/L
56	Tiadinil	0.1 mg/L	113	Mepronil	0.1 mg/L
57	Thiram	0.02 mg/L	114	Molinate	0.005 mg/L

Table 1-4 Items for Further Study

No.	Items	Target Value
1	Silver	-
2	Valium	0.7 mg/L
3	Bismuth	-
4	Molybdenum	0.07 mg/L
5	Acrylamide	0.0005 mg/L
6	Acrylic acid	-
7	17- $\beta$ -Estradiol	0.00008 mg/L(P)
8	Ethynyl-Estradiol	0.00002 mg/L(P)
9	Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	0.5 mg/L
10	Epichlorohydrin	0.0004 mg/L(P)
11	Chloroethene	0.002 mg/L
12	Vinyl Acetate	-
13	2,4-Diaminotoluene	-
14	2,6-Diaminotoluene	-
15	N,N-Dimethylaniline	-
16	Stylene	0.02 mg/L
17	Dioxins	1pgTEQ/L (P)
18	Triethylenetetramine	-
19	Nonylphenol	0.3 mg/L (P)
20	Bisphenol A	0.1 mg/L (P)
21	Hydrazine	-
22	1,2-Butadiene	-
23	1,3-Butadiene	-
24	Dibutyl phtalate	0.01 mg/L (P)
25	Dibutyl benzyl phtalate	0.5 mg/L (P)
26	Microcystin – LR	0.0008 mg/L (P)
27	Organotin compounds	0.0006 mg/L (P)(TBT0)
28	Bromochloroacetic acid	-
29	Bromodichloroacetic acid	-
30	Dibromochloroacetic acid	-
31	Bromoacetic acid	-
32	Dibromoacetic acid	-
33	Tribromoacetic acid	-
34	Trichloroacetnitrile	-
35	Bromochloroacetnitrile	-
36	Dibromoacetnitrile	0.06 mg/L
37	Acetaldehyde	-
38	MX	0.001 mg/L
39	Xylene	0.4 mg/L
40	Perchloric acid	0.025 mg/L
41	N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	0.0001 mg/L
42	Aniline	0.02 mg/L
43	Quinoline	0.0001 mg/L
44	1,2,3-Trichlorobenzene	0.02 mg/L
45	Nitrioltriacetic acid (NTA)	0.2 mg/L

このうち、水質管理目標設定項目に定める農薬類については、114物質のそれぞれに目標値が定められており、下記の式で与えられる検出指標値（個々の農薬について検出値を目標値で割った値の和）が1を超えないこととする総農薬方式で管理が行われている<sup>4)</sup>。

$$DI = \sum_i \frac{DV_i}{GV_i} \leq 1$$

DI: Value of detection index

DVi: Detection value of pesticide *i*

GV*i*: Target value of pesticide *i*

### 1.3 水質検査の実施頻度と実施体制

#### (1) 水質検査の実施頻度

水道水は、水質基準に適合するものでなければならず、水道事業者、水道用水供給事業者及び専用水道設置者（以下、「水道事業者等」という。）は、この水質基準項目について定期及び臨時に水質検査を行うことが義務づけられている。定期の水質検査については、過去の検査結果や水源の状況等を勘案し、状況に応じて検査頻度を減じたり、検査の実施を省略することができる。その判断フロー<sup>7)</sup>を、**Fig. 1-2**に示す。

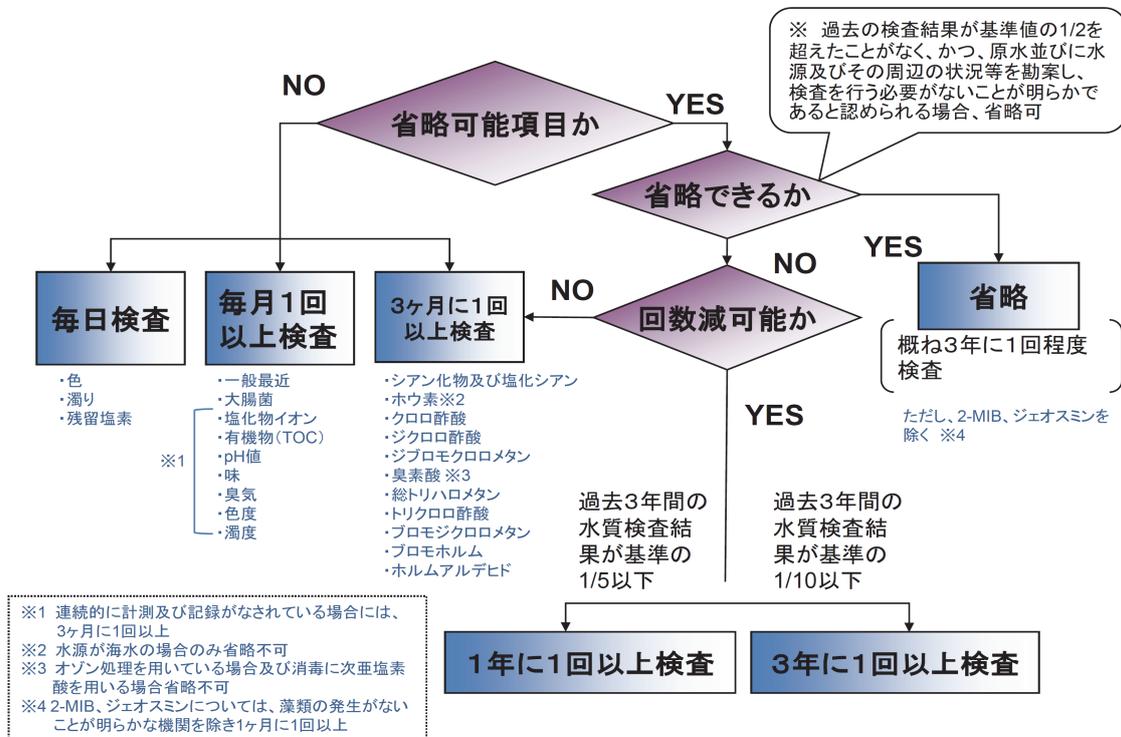


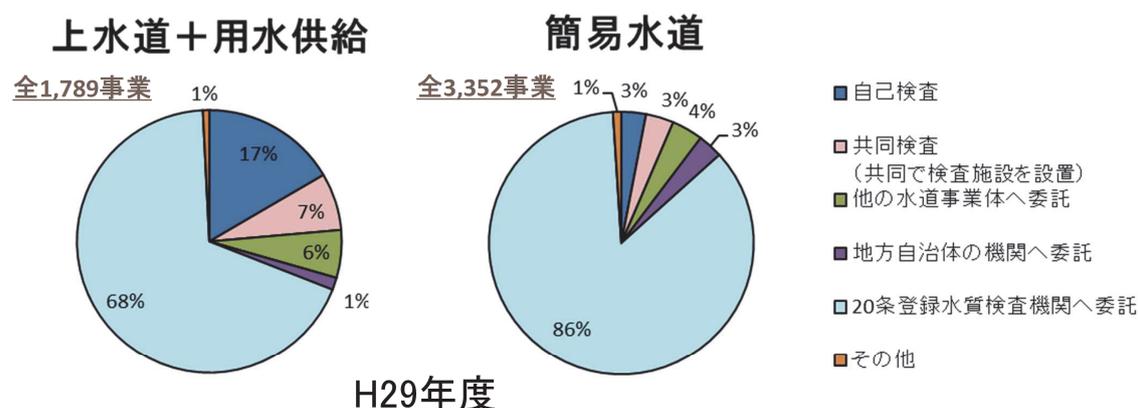
Fig. 1-2 Scheme of omission or reduction of water quality inspection numbers

出典：平成22年度第1回水質検査の信頼性確保に関する取組検討会 配布資料(2010)<sup>7)</sup>

## (2) 水質検査の実施体制

水道水質検査は、水道法第20条に基づき、水道事業者等が行わなければならないとされており、水道事業者等は原則として自らが必要な検査施設を設けるべきこととされている。しかし、自己検査ができない場合には地方公共団体の機関又は厚生労働大臣の登録を受けた者（以下、「登録検査機関」という。）に委託して検査を行うことを認めている。

水質検査機関の登録制度は、平成15年の水道法改正により導入され、その数は令和2年1月6日現在、210機関となっている。水道事業者等の大半は、自らの水質検査部門を保有していないため、水質検査を登録検査機関に委託する機会は年々増加しており、例えば平成29年度においては **Fig. 1-3** に示すとおり<sup>8)</sup>、上水道事業及び水道用水供給事業については68%が、簡易水道事業については86%が、登録検査機関に水質検査を委託する状況となっている。



**Fig. 1-3 Commissioned ratio of water quality inspection**

出典：水道水質検査精度管理に関する研修会 令和元年度研修会配布資料(2020)<sup>8)</sup>

水質検査機関の登録制度が導入されて以降、他の登録検査機関との受注競争による水質検査受託料金の低下と、それに伴う水質検査の精度管理の確保が問題となり、その詳細は厚生労働省健康局水道課長が設置した「水質検査の信頼性確保に関する取組検討会」の報告書<sup>9)</sup>に記載されているとおりである。水質検査機関は、厚生労働省が毎年度実施する「水道水質検査精度管理のための統一試料調査」への参加と日常業務確認調査を受けることや、一般社団法人全国飲料水検査協会が実施する飲料水検査外部精度管理調査に参加すること、あるいは日本水道協会による「水道水質検査優良試験所規範（水道 GLP）」の認定を受けることを通じて、水質検査体制の整備や精度管理の確保に向けた取り組みを日々行っている。

### 1.4 水質検査法

水質基準項目の検査は、「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成15年7月22日厚生労働省告示第261号）」に示された検査法<sup>10)</sup>（以下、告示法という）に従い、実施しなければならない。また、水質管理目標設定項目の検査は、「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について（平成15年10月10日付健水発第1010001号）」の「別添4 水質管理目標設定項目の検査方法」として通知された検査法<sup>11)</sup>（以下、通知法という）を用いて行うのが一般的である。ただし、告示法と異なり通知法については、検査機関が独自に開発した検査法で、厚生労働省から発出されている「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」<sup>12)</sup>（以下、ガイドラインと略す）による妥当性が確認できたものについても、使用してよいことになっている。要検討項目については、標準検査法は示されておらず、上水試験方法<sup>13)</sup>などを参考に、各検査機関において妥当性を確認した検査法を用いて行うこととなる。これらの概要を Fig. 1-4 に、また水質基準項目及び水質管理目標設定項目の標準検査法の内容を Table 1-5 に示す。

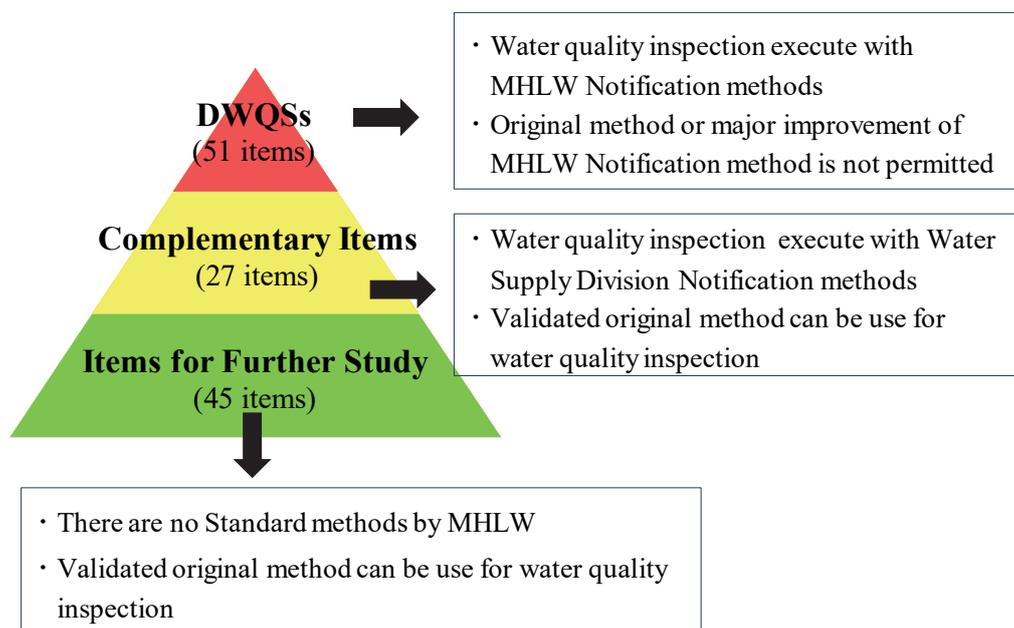


Fig. 1-4 Scheme of test method for water quality inspection

Table 1-5 Standard Method for DWQSS

Standard method	Items
Sensory analysis	Taste, Odor
Incubator	Common Bacteria, <i>E. Coli</i>
Analytical balance	Total residue
pH meter with glass electrode	pH Value
Absorption spectrophotometer	Color, Turbidity
Atomic absorption photometer	Hg
TOC analyzer	TOC
Flameless atomic absorption photometer	Cd, Se, Pb, Cr <sup>6+</sup> , Zn, Al, Fe, Cu, Na, Mn, Ca, Mg
Ion chromatography	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , CN, F, Chlorate, Bromate, Na, Cl <sup>-</sup>
Inductively-coupled plasma emission analyzer (ICP)	Cd, Pb, Cr <sup>6+</sup> , Zn, Al, Fe, Cu, Na, Mn, Ca, Mg
Inductively-coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS)	Cd, Se, Pb, Cr <sup>6+</sup> , Zn, Al, Fe, Cu, Na, Mn, Ca, Mg
Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)	Carbon tetrachloride, 1,4-dioxane, 1,2-Dichloroethylene, Dichloromethane, Tetrachloroethylene, Trichloroethylene, Benzene, Chloroacetic acid, Chloroform, Dichloroacetic acid, Dibromochloromethane, Total trihalomethane, Trichloroacetic acid, Dibromochloromethane, Bromoform, Formaldehyde, Geosmin, 2-Methylisoborneol, Phenols
Liquid chromatography	Formaldehyde, Anionic surface active agent, Nonionic surface active agent
Liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS)	Chloroacetic acid, Dichloroacetic acid, Trichloroacetic acid, Formaldehyde, Phenols

Note: Some of the items can be measured by different kind of methods.

Table 1-6 Standard Method for Complementary Items

Standard method	Items
Sensory analysis	Threshold Odor Number
Incubator	heterotrophic bacteria
Analytical balance	Total residue
pH meter with glass electrode	pH Value
Absorption spectrophotometer	Turbidity, Chlorine residue
Titration	Organic substances (Potassium permanganate consumption), Free carbon dioxide
Calculation	Causticity (Langelier's Index)
Ion chromatography	HClO <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub> , Ca, Mg
Inductively-coupled plasma emission analyzer (ICP)	Sb, U, Ca, Mg, Mn, Al
Inductively-coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS)	Sb, U, Ca, Mg, Mn, Al
Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)	1,2-dichloroethane, Diethylexyl phthalate, Dichloroacetonitrile, Chlorate hydrate, 1,1,1-Trichloroethane, Methyl-t-butylether (MTBE), 1,1-Dichloroethylene
Liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS)	PFOS and PFOA

Note: Some of the items can be measured by different kind of methods.

Table 1-7 Standard Method for Pesticides in Complementary Items

No.	Items	Standard method				
		SPE-GC/MS (Method No.5)	SPE-GC/MS (Method No.5-2)	LC/MS (Method No.20-2)	other GC/MS	other LC/MS
1	1,3-Dichloropropene (D-D)				○*	
2	2,2-DPA (Dalapon)			○		
3	2,4-D (2, 4-PA)			○		○
4	EPN	○*		○		
5	MCPA			○*		
6	Asulam			○*		○
7	Acephate			○		
8	Atrazine	○		○		
9	Anilofos	○*		○		
10	Amitraz			○*		
11	Alachlor	○		○		
12	Isoxathion	○		○		
13	Isofenphos	○*		○		
14	Isoprocarb (MIPC)	○		○		
15	Isoprothiolane (IPT)	○		○		
16	Iprobenfos (IBP)	○		○		
17	Iminoctadine					○
18	Indanofan		○	○*		
19	Esprocarb	○		○		
20	Etofenprox	○		○		

Table 1-7 –continued-

21	Endosulfan	○				
22	Oxaziclomefone			○		
23	Oxine-copper					○
24	Orysastrobin		○	○		
25	Cadusafos		○	○		
26	Cafenstrole	○		○		
27	Cartap			○		
28	Carbaryl (NAC)			○		○
29	Carbofuran			○		
30	Quinoclamín (ACN)	○	○	○		
31	Captan	○				
32	Cumyluron		○	○		
33	Glyphosate					○
34	Glufosinate					○
35	Clomeprop			○		
36	Chloronitrofen (CNP)	○*				
37	Chlorpyrifos	○*		○		
38	Chlorothalonil (TPN)	○		○*		
39	Cyanazine		○	○		
40	Cyanophos (CYAP)		○	○*		
41	Diuron (DCMU)			○		○
42	Dichlobenil (DBN)	○				
43	Dichlorvos (DDVP)	○		○*		
44	Diquat					○
45	Disulfoton (Ethylthiometon)	○		○*		
46	Dithiocarbamate Fungicides				○*	
47	Dithiopyr	○		○		
48	Cyhalofop-butyl		○			
49	Simazine (CAT)	○		○		
50	Dimethametryn	○		○		
51	Dimethoate	○		○		
52	Simetryn	○		○		
53	Diazinon	○		○		
54	Dymron			○		
55	Dazomet, Metham and Methyl isothiocyanate (MITC)				○	
56	Tiadimil			○		
57	Thiuram					○
58	Thiodicarb			○		
59	Thiophanate-methyl			○*		○
60	Thiobencarb	○		○		
61	Tefuryltrione			○		
62	Terbucarb (MBPMC)	○		○		
63	Triclopyr			○*		○
64	Trichlorfon (DEP)	○		○		
65	Tricyclazole			○		○
66	Trifluralin	○		○*		
67	Napropamide	○		○		
68	Paraquat					○
69	Piperophos	○*		○		
70	Pyraclonil			○		

Table 1-7 –continued-

71	Pyrazoxyfen		○	○		
72	Pyrazolynate			○*		
73	Pyridaphenthion	○*		○		
74	Pyributicarb	○		○		
75	Pyroquilone	○		○		
76	Fipronil			○		○
77	Fenitrothion (MEP)	○		○*		
78	Fenobucarb (BPMC)	○		○		
79	Ferimzone			○		
80	Fenthion (MPP)	○		○		○
81	Phenthoate (PAP)	○		○		
82	Fentrazamide			○		
83	Fthalide	○		○		
84	Butachlor		○	○		
85	Butamifos	○		○		
86	Buprofezin	○		○		
87	Fluazinam			○		
88	Pretilachlor	○		○		
89	Procymidone	○		○		
90	Prothiophos				○*	
91	Propiconazole	○		○		
92	Propyzamide	○		○		
93	Probenazole					○
94	Bromobutide	○		○		
95	Benomyl			○		○
96	Pencycuron	○		○		
97	Benzobicyclon			○*		
98	Benzofenap			○		
99	Bentazon			○	○	○
100	Pendimethalin	○		○		
101	Benfuracarb			○		○
102	Benfluralin (Bethrodine)	○		○*		
103	Benfuresate		○	○		
104	Fosthiazate		○	○		
105	Malathion (Malathon)	○		○		
106	Mecoprop (MCCP)			○	○	○
107	Methomyl			○		○
108	Metalaxyl	○		○		
109	Methidathion (DMTP)	○		○		
110	Metominostrobin		○	○		
111	Metribuzin		○	○		
112	Mefenacet	○		○		
113	Mepronil	○		○		
114	Molinate	○		○*		

Note: Some of the items can be measured by different kind of methods.

\*: Non-standard method due to lack of accuracy, precision or validity.

水道水質検査については、「水質検査技術の進歩は格段のものがあり、これらの技術革新を適切にとり入れていくことも必要である。」「水質検査技術の革新等に柔軟に対応できるようにするため、公定検査法以外であっても、これらと同等以上の方法と認められる検査方法については、これを積極的に公定検査法と認める柔軟なシステムを工夫することが必要である。」との観点から、厚生労働省健康局水道課長が設置した「水道水質検査法検討会」を通じて、最新の科学的知見を踏まえて水質検査法について検討を行うとともに、水質検査法の柔軟な見直しのシステムが運用されている<sup>14)</sup>。

近年の標準検査法改正については **Table 1-8** に示すとおりであり、LCMS を用いたより精度の高い検査法が多く提示されているのが特徴である。また、ガイドライン<sup>12)</sup>が2013年に通知されたこともあり、以降に示された標準検査法は全て、ガイドラインに示された精度について、複数機関によるバリデーションを通じてあらかじめ確認されていることが大きな特徴である。

**Table 1-8 Revision history of standard method for water quality inspection**

Year	MHLW Notification methods for DWQSS	Water Supply Division Notification methods for Complementary Items
2012	Method No.17-2 (Haloacetic acids, LC-MS/MS)	
2013		Enactment of Japanese validation guideline for tap water analysis Method No.5-2 (46 pesticides) Method No.20-2 (64 pesticides)
2015	Method No.29-2 (Phenols, SPE-LC-MS/MS)	Method No.20-2 (Cartap, Pyraclonil, Ferimzone) Method No.21 (Iminoctadine, Diquat, Paraquat) Method No.22 (Glyphosate, Glufosinate, AMPA) Method No.23 (Dazomet, Metham) Method No.24 (Dithiocarbamate Fugicides) Method No.25 (Prothiofos)
2016	Method No.19-2 (Formaldehyde, HPLC, LC-MS/MS)	
2017	Method No.18-2 (Bromate, LC-MS/MS)	Method No.20-2 (Tefryltrion)
2018		Revision of Japanese validation guideline for tap water analysis Method No.25 (prothiophos oxon) Method No.20-2 (114 pesticides)
2019		Method No.20-2 (5Z-orysastrobin) Method No.5-2 (5Z-orysastrobin)

## 1.5 妥当性評価の基準

ガイドライン<sup>12)</sup>に示された妥当性評価項目の詳細は以下のとおりであり、本研究においては、これらの基準を満たせる検査法の構築を目標とした。

### (1) 検量線の評価

標準試料を用いて作成した検量線について、以下の性能パラメータを求め、それぞれの目標に適合していることを確認する。

items	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)
Inorganic substance	80 % ~ 120 % (at every calibration point)	≤20%
Organic substance	80 % ~ 120 % (at every calibration point)	≤10%

### (2) 添加試料の評価

水道水添加試料を用いて試験し、その結果から以下の性能パラメータを求め、それぞれの目標に適合していることを確認する。

items	Accuracy (%)	Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
Inorganic substance	70 % ~ 130 %	≤10%	≤15%
Organic substance	70 % ~ 130 %	≤20%	≤25%
Pesticides	70 % ~ 130 %	≤30%	≤35%

## 1.6 本研究の目的と内容

水道水の安全を確保するため、水質に係わる全ての項目について高い検査精度で濃度測定し、その結果を浄水処理施設の操作運転に反映することによる水道システム全般の統合管理が重要である。水道水質の検査における精度確保を図るため、厚生労働省は2013年にガイドラインを通知し、標準検査法の設定時あるいは新しい標準検査法の導入時にガイドラインに示された評価基準を満足できることを予め確認することを検査機関に求めている。このガイドライン制定以前に示された標準検査法については、ガイドラインに示された評価基準に対応した必要な測定精度を満たせない恐れがある。また、一部の水質項目に係わる標準検査法については、必要な真度、精度又は定量下限を確保できない可能性が高い「参考法」に位置付けられているものもある。そこで本研究では、それらの検査法のうち、検量線

の直線性や結果の再現性に関する問題が多く報告されている非イオン界面活性剤（NIS）告示法と、「参考法」であり、かつ農薬類に対して求められる定量下限値（目標値の 1/100）を満足できていないクロロニトロフェン（CNP）通知法の両標準検査法について、水道水質検査におけるより一層の精度確保を目的として、測定手法の最適化に関する検討を行うこととした。

### 1.7 本論文の構成

本論文の構成を **Fig. 1-5** に示す。

第1章では、研究の背景と目的について記述する。

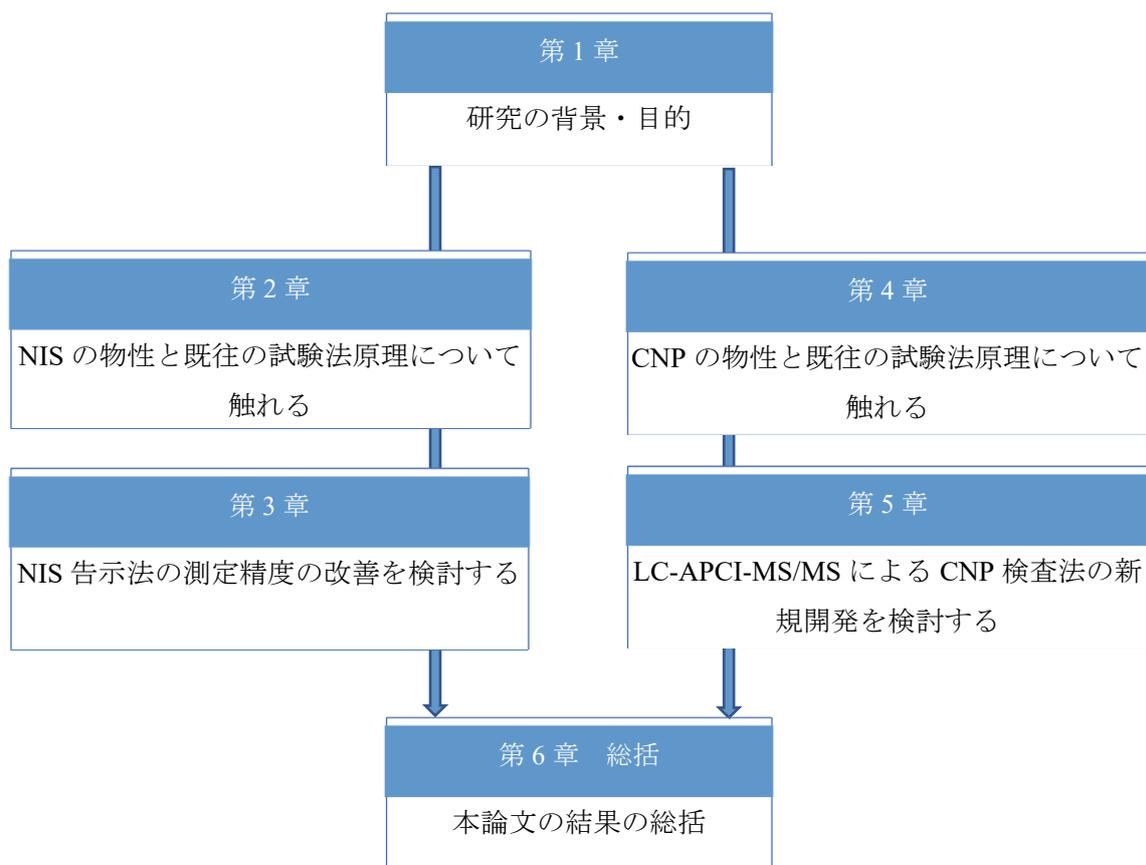
第2章では、界面活性剤の種類や物性について整理するとともに、NISの物性や水環境動態について述べる。また、NIS検査法について既往の研究成果をまとめるとともに、NIS告示法の発色操作部を構成する Co-NCS法と PAR法の原理について、概略を述べる。

第3章では、第2章で述べたこれまでの知見をもとに、NIS告示法の発色操作部を構成する Co-NCS法と PAR法の2つの錯形成条件とその収率に着目し、錯形成条件の最適化に関する検討を行う。また、得られた最適条件を用いて、水道水と水道原水に対して添加回収試験を行い、妥当性の評価を行う。

第4章では、CNPの除草剤としての使用経緯やその環境動態について整理するとともに、CNP通知法の概要について説明する。また、CNP検査法として本研究で用いた LC-MS/MS法について、他の測定法との比較を交えながら、その原理と特徴について述べる。

第5章では、第4章で述べたこれまでの知見をもとに、目標値の 1/100まで精度良く測定できる CNP及びその代謝物である CNP-アミノ体の LC-MS/MSによる一斉分析法の確立を目的として検討を行う。そして、構築した試験法を用いて水道水添加回収試験を行い、その妥当性について評価する。

第6章では、本論文の結果の総括ならびに今後の展望課題について提案する。



**Fig. 1-5 Flow chart of this thesis**

## 第2章 NISの物性と試験法原理

### 2.1 はじめに

界面活性剤は、液体の表面張力を減少させる性質を持ち、これを利用して、湿潤、浸透、濡れ、分散、乳化、可溶化、起泡、消泡、洗浄などの用途として多くの産業で利用されている。本章では、界面活性剤の種類や物性などに関連した基礎情報を整理するとともに、水道水質基準項目であるNISの水質基準値設定背景、ならびにNISの検出に用いられる試験法の原理とその問題点について述べる。

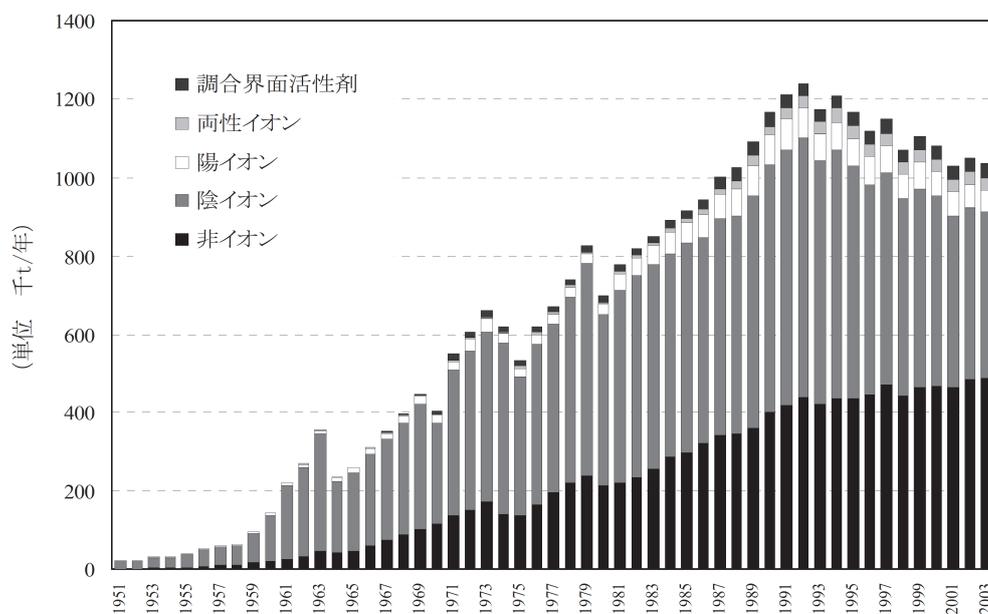
### 2.2 界面活性剤の種類と水環境動態

#### (1) 界面活性剤の種類と国内動向

界面活性剤は、Table 2-1 に示すように、親水基のイオン性により、陰イオン界面活性剤、NIS、両性界面活性剤、陽イオン界面活性剤の4種類に分類される。国内における界面活性剤の生産量推移<sup>15)</sup>はFig. 2-1 に示すとおりであり、1950年ごろからの40年あまりの間にその生産量は飛躍的に伸びた。陰イオン界面活性剤の生産量は、1990年代頃より生産量が減少する傾向にあるが、一方でNISの生産量は、衣料用の液体洗剤として広く用いられるようになったため、近年伸び続けている。このうち、国内におけるNISの生産量の内訳<sup>16)</sup>は、Fig. 2-2 に示すとおりである。NISの中ではアルコールエトキシレート(AE)の生産量が最も多く、家庭用では衣類用洗剤の主成分として、一部は台所用洗剤としても用いられている。アルキルフェノールエトキシレート(APE)は主に工業用や農薬の展着剤として用いられているが、環境中で分解する過程でアルキルフェノール(AP)が生成し、これが環境ホルモン作用を持つため、近年はその消費量も減少傾向にある。

**Table 2-1 Typical types of surfactants**

Classification	Type	General formula
Anionic	Fatty acid salts (Soap)	R-COONa
	Linear alkyl benzene sulfonates (LAS)	R-(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )SO <sub>3</sub> Na
	Alkyl sulfates (AS)	R-OSO <sub>3</sub> Na
	Alkyl ether sulfates (AES)	R-O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> Na
	Methyl ester sulfonates (MES)	R-CH(SO <sub>3</sub> Na)COOCH <sub>3</sub>
Nonionic	Polyoxyethylene alkyl ethers (AE)	R-O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H
	Alkylphenol ethoxylates (APE)	R-(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H
	Fatty acid diethanolamide (DEA)	R-CON(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>
Cationic	Alkyltrimethyl ammonium salts	R-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · Cl <sup>-</sup>
	Dialkyl dimethyl ammonium chloride	R <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · Cl <sup>-</sup>
	Ester-type dialkyl ammonium salts	(R-COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	Alkylpyridinium chloride	R-(N <sup>+</sup> C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> ) · Cl <sup>-</sup>
Zwitterionic	Alkyl carboxy betaine	R-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
	Alkyl amine oxide (AO)	R-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O <sup>-</sup>



**Fig. 2-1 Production weight volume trend of surfactants**

出典：詳細リスク評価書シリーズ14 アルコールエトキシレート（洗剤）(2007)<sup>15)</sup>

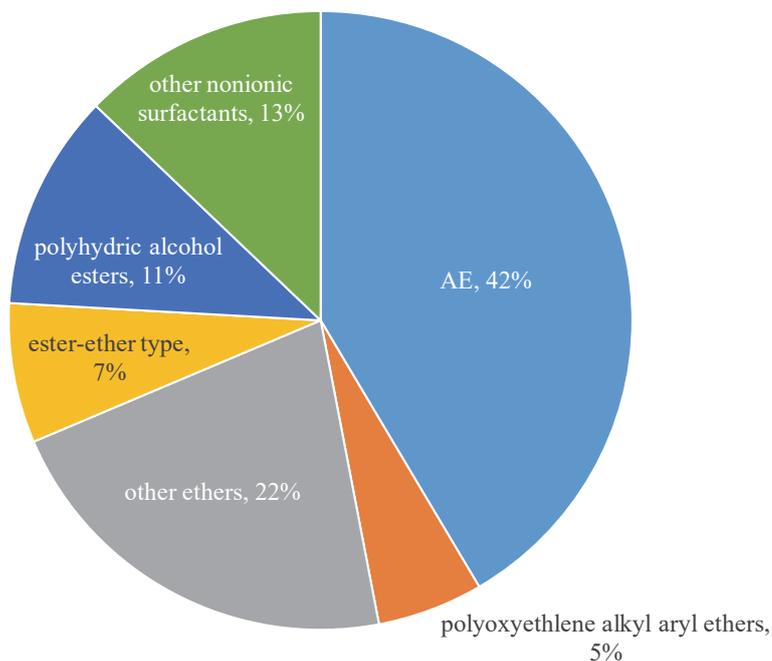


Fig. 2-2 Production weight volume ratio of NIS in Japan (2018)<sup>16)</sup>

## (2) AEの種類と物性

代表的なNISであり、また本研究の主要な測定対象成分であるAEについて、その種類と物性を述べる。AEは、疎水基である脂肪族アルキル鎖(C鎖)と、親水基の酸化エチレン(EO)の付加重合により合成される。市販されているAEは、通常、C鎖の鎖長とEOモル数の異なる多数の同族体から構成される混合物であり、EOの付加モル数により親水性などが異なる。洗浄剤には、C鎖長12~15にEOを6~10モル程度付加したものが、一般的に用いられる。AEの物性値は、僅かな同族体に関するものしか報告されていないため、ここではU.S. EPAのEstimation Program Interface (EPI) Suiteを用いた、各同族体の推定物性値をTable 2-2に示す<sup>15)</sup>。

Table 2-2 Estimated chemical and physical properties of AE homologues<sup>15)</sup>

AE homolog	Molecular Weight [g/mol]	log <i>K<sub>ow</sub></i>	Boiling Point [°C]	Melting Point [°C]	Water Solubility [mg/L]
C12EO1	230.4	4.5	318.2	64.8	14.19
C12EO2	274.5	4.22	355.6	98.1	13.86
C12EO3	318.5	3.95	390.8	130.8	13.18
C12EO4	362.6	3.67	426.1	154	12.3
C12EO5	406.6	3.4	461.4	175.9	11.31
C12EO6	450.7	3.12	496.6	197.3	10.27
C12EO7	494.7	2.85	531.9	222.7	9.24
C12EO8	538.8	2.57	567.1	244	8.25
C12EO9	582.8	2.3	602.4	260.4	7.32
C12EO10	626.9	2.03	637.7	276.9	6.45
C12EO11	670.9	1.75	672.9	293.4	5.66
C12EO12	715	1.48	708.2	309.8	4.94
C12EO13	759	1.2	743.4	326.3	4.3
C12EO14	803.1	0.93	778.7	342.8	3.73
C12EO15	847.1	0.65	814	349.8	3.22
C13EO1	244.4	4.99	331.3	74.2	4.53
C13EO2	288.5	4.71	367.2	107.1	4.38
C13EO3	332.5	4.44	402.4	139.8	4.14
C13EO4	376.6	4.16	437.7	162.3	3.85
C13EO5	420.6	3.89	473	183.8	3.52
C13EO6	464.7	3.61	508.2	205	3.19
C13EO7	508.7	3.34	543.5	230.4	2.86
C13EO8	552.8	3.07	578.7	249.4	2.55
C13EO9	596.9	2.79	614	265.9	2.25
C13EO10	640.9	2.52	649.3	282.3	1.98
C13EO11	685	2.24	684.5	298.8	1.74
C13EO12	729	1.97	719.8	315.3	1.52
C13EO13	773.1	1.69	755.1	331.7	1.32
C13EO14	817.1	1.42	790.3	348.2	1.14
C13EO15	861.2	1.14	825.6	349.8	0.99
C14EO1	258.5	5.48	343.4	83.4	1.44
C14EO2	302.5	5.2	378.8	116.1	1.38
C14EO3	346.6	4.93	414	141.9	1.3
C14EO4	390.6	4.65	449.3	170.6	1.2
C14EO5	434.7	4.38	484.6	187.2	1.1
C14EO6	478.7	4.11	519.8	212.7	0.99
C14EO7	522.8	3.83	555.1	238.1	0.88
C14EO8	566.8	3.56	590.3	254.8	0.79
C14EO9	610.9	3.28	625.6	271.3	0.69
C14EO10	654.9	3.01	660.9	287.7	0.61
C14EO11	699	2.73	696.1	304.2	0.53
C14EO12	743	2.46	731.4	320.7	0.47
C14EO13	787.1	2.18	766.7	337.2	0.4
C14EO14	831.2	1.91	801.9	349.8	0.35
C14EO15	875.2	1.64	837.2	349.8	0.3

Table 2-2 -continued-

C15EO1	272.5	5.97	355.1	92.5	0.46
C15EO2	316.5	5.69	390.4	125.1	0.44
C15EO3	360.6	5.42	425.6	150.2	0.41
C15EO4	404.6	5.15	460.9	178.8	0.37
C15EO5	448.7	4.87	496.2	194.9	0.34
C15EO6	492.7	4.6	531.4	220.3	0.31
C15EO7	536.8	4.32	566.7	243.8	0.27
C15EO8	580.9	4.05	602	260.2	0.24
C15EO9	624.9	3.77	637.2	276.7	0.21
C15EO10	669	3.5	672.5	293.2	0.19
C15EO11	713	3.22	707.7	309.6	0.16
C15EO12	757.1	2.95	743	326.1	0.14
C15EO13	801.1	2.68	778.3	342.6	0.12
C15EO14	845.2	2.4	813.5	349.8	0.11
C15EO15	889.2	2.13	848.8	349.8	0.09

### (3) NISの水環境動態

AE及びAPEは、下水処理により90%以上除去されることが明らかとなっている<sup>17)</sup>。APEの消化処理過程でAPが生成することも明らかとなっているが、二次処理過程(活性汚泥法)でAPの大半が除去される。国内の汚水処理人口普及率は、1998年度末には67%であったものが2018年度末には91.4%<sup>18)</sup>へと向上しており、すなわち現在は、生活雑排水の9割近くは排水処理を受けるため、ここでNISの大半が除去されていると考えられ、また、残りは未処理で公共用水域に排出されている。

排出されたNISは河川水中で分解するものの、実際の河川水を用いた分解試験によるAEの推定半減期は1.12日であり、また調査に用いた同族体の最大値は12.72日、最小値は0.16日と報告されており、EOモル数の増加に伴って分解しにくくなる傾向がみられる<sup>15)</sup>。なお、日本の河川では海への到達時間が短いことから、その一部は、河川水中では完全に分解することなく海域へ流出していると考えられる。APEについては、疎水基であるアルキル基が分岐型の場合、生分解は遅くなり、一部は難分解物を生成することが明らかとなっている。

河川水中のNISの一部は、沈降や懸濁物質への吸着により底質に移行するが、吸着定数の比較から非イオン系は陰イオン系よりもはるかに吸着しやすく、その吸着しやすさは、AE>APE>LAS>AES>AOSの順であるとされている<sup>17)</sup>。値の直接比較は困難であるが、底質中には水中濃度と比較すると100倍程度多いと言われている。

### 2.3 NISの水質基準値と設定背景

わが国における界面活性剤に関する水質基準項目としては、1966年に設定された陰イオン界面活性剤(基準値0.5mg/L)がある。当時、合成洗剤の使用量増加による、生分解性の悪い側鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(ABS)の環境への排出が社会的な問題に発展し、その発泡性による上水への影響が懸念されたためである。更に1992年には、泡立ちの抑制を確実にする観点から、陰イオン界面活性剤の水質基準が0.2mg/Lに強化され

た。この間、いわゆるソフト化の行政指導による、ABSよりも易分解性のLASへの転換もあり、環境中での検出濃度は低下していった<sup>19)</sup>。

一方、NISについては、国内における生産量が年々増加し、上述のように、近年では陰イオン界面活性剤の生産量を上回っている。WHOや先進諸国では飲料水質基準には定められていないが、田畑ら<sup>20)</sup>の研究により、NISの発泡性に関する評価値として0.02 mg/Lが示されたこともあり、これと原水及び浄水における検出状況との比較検討も踏まえ、水道水の発泡の観点から水質管理の徹底を図るひとつとして2004年に水質基準項目に追加され、基準値0.02 mg/Lが設定された。

## 2.4 NISの検査法と検出原理

### (1) 定量分析法の変遷

これまで用いられてきた主要なNIS定量分析法を、Table 2-3に示す。

Table 2-3 Major analysis methods of NIS and their features

	Analysis method	Major literature	Features
Chemical Techniques	Potassium picrate active substances (PPAS) method	Favretto et al. (1983) <sup>21)</sup>	Quantitate total amount of POE-type NIS (contain more than 3 EO moles), difficult to handle picrate safely
	Cobalt thiocyanate active substances (CTAS) method	Crabb and Persinger (1964) <sup>22)</sup>	Quantitate total amount of POE-type NIS (contain more than 3 EO moles), employed as several official method (JIS K0102, APHA, etc)
	Bismuth active substances (BiAS) method	Wickbold (1972) <sup>23)</sup>	Quantitate total amount of POE-type NIS (contain more than 3 EO moles), this requires lengthy procedures and takes a long time
Physical Chemical Techniques	Derivatization LC/MS	Dunphy et al. (2001) <sup>24)</sup>	Quantitate also NIS with short EO chains, this requires complex procedures and takes a long time
	LC-ESI-MS	Zembrzuska et al. (2014) <sup>25)</sup>	Fatty acid and AE with a single etoxy group (1 or 2) can not determine
	Derivatization HPLC (UV / Fluorescence)	Zanette et al. (1996) <sup>26)</sup> ; Lemr (1996) <sup>27)</sup>	this requires complex procedures

分析手法の分類としては、特殊な試薬との反応で生成した錯体を、分光光度計または原子吸光光度計で測定する化学的手法と、試薬を用いて誘導体化処理したものを高速液体クロマトグラフやガスクロマトグラフで測定する物理化学的手法の2つに分類できる。

化学的手法は、ポリオキシエチレン (POE) 型 NIS の総量を測定する手法であり、AE と APE の区別はできない。陰イオン界面活性剤など他の物質に干渉されやすいという欠点もある。また、EO モル数の少ない同族体の検出感度が低いため、一般的には EO モル数 3 以上しか定量できない。

物理化学的手法のうち、LC/MS を用いたものについては、広い範囲の同族体を高感度で検出できるという利点があるが、定量用途として使用できる各同族体を含んだ標準物質が存在しないことと、その分析操作には熟練を要することから、定性用あるいは調査研究用では広く用いられているが、定量用の公定法としては採用されていない。

## (2) 水道水質検査に用いる NIS 告示法の概要

水道水質検査に用いる NIS の検査法<sup>10)</sup>としては、固相抽出-吸光光度法及び固相抽出-高速液体クロマトグラフ法が定められている。両方法とも、前処理部は同じ原理を用いているが、水質基準項目は原則として基準値 (0.02 mg/L) の 1/10 まで測定することが求められるため<sup>11)</sup>、これを満たせる固相抽出-高速液体クロマトグラフ法が一般的に用いられる。告示法 (以降、「固相抽出-高速液体クロマトグラフ法」のことを指す) のフローを、**Fig. 2-3** に示す。告示法は、**Table 2-3** の分類に照らし合わせると、CTAS 法 (Co-NCS 法と同義) を元に、これに PAR 法を組み合わせることで低い定量下限値を達成した改良法と言える。告示法の原理は、試料水中の NIS を固相抽出し、トルエン溶液中で NIS とチオシアン酸コバルト (Co-NCS) の複合錯体 (Co-NIS) を形成させた後、この複合錯体中のコバルトを水溶液中に逆抽出してコバルトと 4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシノールの錯体 (Co-PAR) を形成させ、その発色を測定することで NIS 濃度を間接的に定量する方法である<sup>28)</sup>。

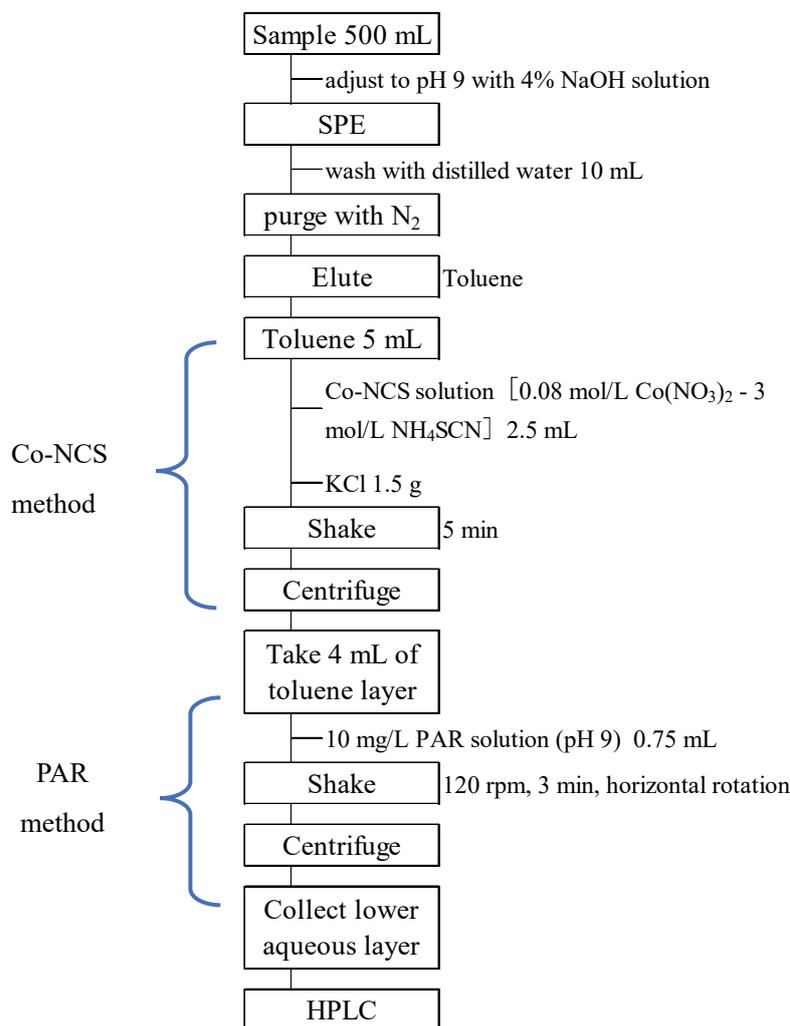
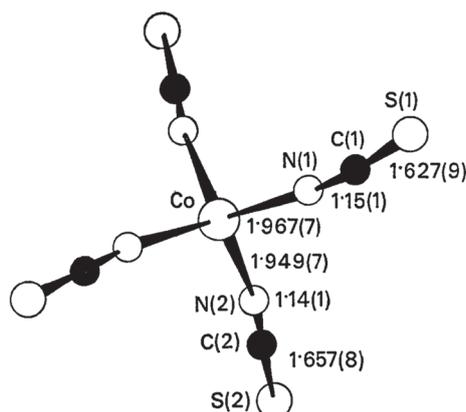


Fig. 2-3 Procedure of official method for the determination of NIS in tap water<sup>10)</sup>

## 2.5 Co-NCS法の概要

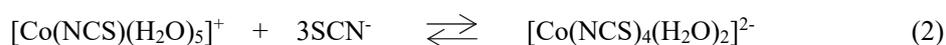
Co-NCS法で用いるCo-NCS溶液は、硝酸コバルトと高濃度（告示法では3 mol/L）のチオシアン酸アンモニウムからなる青色の水溶液である。この呈色については、1877年にMorrellにより報告<sup>29)</sup>され、続いて1882年にVogel<sup>30)</sup>によりコバルトの検出法として示されたこともあり、Co-NCS溶液の青色の呈色反応自体が、1950年代頃まで「Vogel reaction」と呼ばれていた。この青色の呈色は、錯体であるテトライソチオシアナトコバルト(II)イオン[Co(NCS)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>の生成によるものである。Drewら<sup>32)</sup>によって示されたその結晶構造を、Fig. 2-4に示す。

Fig. 2-4 The structure of  $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ Source : Drew *et al.*(1975)<sup>32)</sup>

$\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ は、高濃度（概ね2~3M以上）のチオシアン酸溶液中でのみ生成する極めて生成定数の低い錯体であり、その生成定数<sup>33)</sup>は  $\log K_1 = 1.20$ 、 $\log K_2 = 1.69$ 、 $\log K_3 = -0.10$ 、 $\log K_4 = -2.02$  と推定されている。このため、Co-NCS 溶液に更に水を加えて薄めると、 $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ が解離する一方で  $\text{Co}(\text{NCS})^+$ が生成し、溶液の色が青色から赤色へと変化する。これに、チオシアン酸を過剰量加えると、 $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ が再び生成し溶液が青色を呈する可逆反応が見られる。鈴木と室井<sup>34)</sup>によれば、 $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ の生成反応は段階的に進むが、チオシアン酸があまり過剰でない条件では、まず



の反応がおこり、大過剰のチオシアン酸塩の存在で



がおきると推定されている。

なお、青色の呈色は、 $\text{Co}^{2+}$ を含む低濃度のチオシアン酸溶液にアセトンなどの高極性有機溶媒を添加することでも生じることから、 $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ の生成は溶液の誘電率の影響を受けていると考えられる<sup>34)</sup>。

1950年代以降、機器分析手法を用いた金属イオンの定量法が目覚ましく進歩したことにより、Vogel reaction としてはその後用いられなくなったものの、Hoeve<sup>35),36)</sup>により Co-NCS 溶液を用いた POE 化合物の検出法として報告されて以降、溶媒抽出-吸光光度法による NIS 定量法の開発<sup>22),37)</sup>もあり、現在では、告示法をはじめとした公定法<sup>38),39),40)</sup>に採用されている。

Co-NCS法の測定対象成分であるPOE型のNISは、EO部が水溶液中でらせん構造をとっており、このらせん構造に金属イオンが取り込まれ、NISの金属錯陽イオン(NIS・M<sup>+</sup>)を生成することが知られている。この模式図をFig. 2-5<sup>41)</sup>に示す。

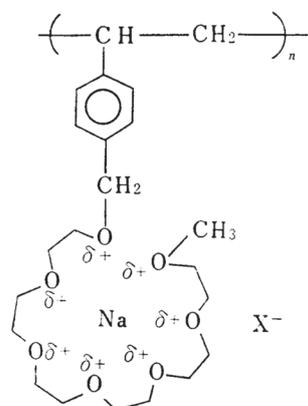


Fig. 2-5 Estimated structure of NIS・M<sup>+</sup> complex

出典：柳田 (1979) <sup>41)</sup>

Co-NCS法は、このNIS・M<sup>+</sup>とCo-NCS溶液中のCo(NCS)<sub>4</sub><sup>2-</sup>からなるイオン対をトルエン層に抽出するものであり、このとき抽出される化学種は、(3)である<sup>42)</sup>と考えられているが、一方で、(4)であるとの記述<sup>43)</sup>もある。



有機層に抽出された複合錯体は青色を呈しているため、この吸光度を測定することでNISを定量することもできるが、告示法<sup>10)</sup>では定量下限値をさらに低くするための手法として、2.6に示すPAR法を組み合わせている。

なお、NISのもつEO鎖長の違いにより、Co-NCS法で得られる吸光度が異なることも知られており、その一例としてC鎖長12のAEを用いた場合に得られる吸光度をFig. 2-6<sup>44)</sup>に示す。どの種類のNISも、EO付加モル数が5~10前後で最大の発色を示し、EO付加モル数が2付近と15~20では、発色が極めて低くなる傾向にある。しかしながら、2.2(2)でも述べたように、一般的に洗浄剤としては、C鎖長12~15にEOを6~10モル程度付加したものが用いられており、これよりEO付加モル数が少なくなるにつれ、その発泡性も低下していく。水質基準項目の非イオン界面活性剤は、発泡性の観点から設定されたものであることを踏まえると、EO付加モル数の違いによる吸光度差は原理上生じるものの、発泡性の高い成分を感度よく検出できるため、発泡性の監視に適していると考えられる。

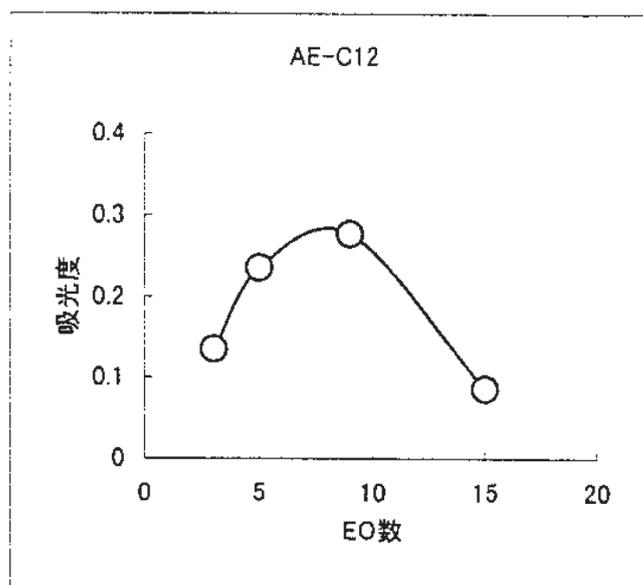


Fig. 2-6 Analytical sensitivity versus the number of molecules of EO in NIS by Co-NCS method

出典：水道における化学物質の毒性，挙動及び低減化に関する研究、平成10年度報告書(1999)<sup>44)</sup>

## 2.6 PAR法の概要

### (1) PARの特性

PAR法について述べるにあたり、まず初めに、反応試薬として用いるPARの特性について述べる。当初、分析試薬として1955年にChengとBray<sup>45)</sup>により1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN)が紹介された後、この類縁化合物であり、水溶性をより高めた金属指示薬としてPollardら<sup>46)</sup>によりPARが報告された。PAN及びPARの構造はFig. 2-7に示すとおりである。また、PARの酸解離定数<sup>47)</sup>はFig. 2-8に示すとおりであり、PARを水に溶解させる場合はこれを考慮して、強酸または強アルカリが一般的に用いられる。

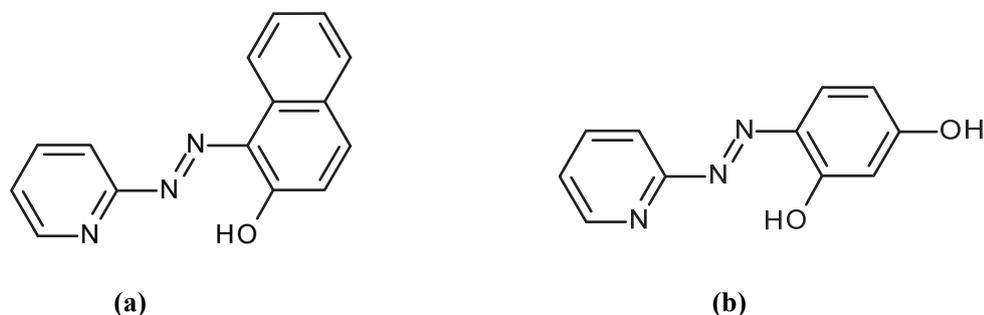
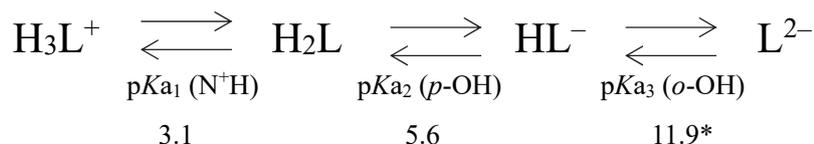
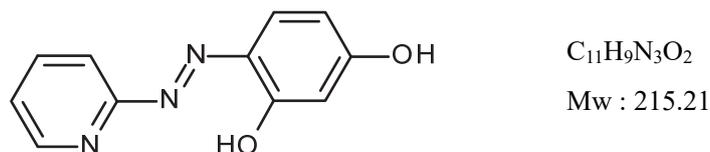


Fig. 2-7 The structure of (a) PAN and (b) PAR

Fig. 2-8 The proton dissociation scheme of PAR<sup>47)</sup>

\* estimated value

PARには、フリー体の他にナトリウム塩が市販されており、その溶解性<sup>47),48)</sup>はTable 2-4に示すとおりである。ナトリウム塩と比べてフリー体の溶解性が著しく低いのは、Fig. 2-9に示すとおり、PARのo-OHとジアゾ基が水素結合しているためであると推定<sup>49)</sup>されており、一方でナトリウム塩の溶解性が高いのは、o-OHのプロトンがナトリウムで置換されているためである。日本では、フリー体が広く使用されてきた経緯があるため入手性にも優れ、これを用いることが多いが、溶解性の問題から手引書<sup>47)</sup>ではナトリウム塩の使用が推奨されている例もあり、海外ではナトリウム塩を使用するケースが多い。告示法<sup>10)</sup>におけるPAR溶液(100 mg/L)の調製方法は、フリー体のPARを用いて「pH 11程度」で溶解させ、「完全に溶けないときは上澄み液を」使用してもよいとされているが、上記のPARのフリー体に関する特性を踏まえると、pH 11程度では溶解性にやや難があることが理解できる。これについては、フリー体ではなくナトリウム塩を使用すれば中性の水に容易に溶けるため、pH 11程度で溶解する必要性も無く、またその溶解性に付随する問題も生じにくいものと考えられる。本研究においても、PARの一ナトリウム塩(メルク、Reag. Ph Eur)を入手し、その溶解性についてあらかじめ確認した。

Table 2-4 Water solubility of PAR and its sodium salts<sup>47), 48)</sup>

Chemical species	Water solubility (H <sub>2</sub> O)
H <sub>2</sub> L	50 mg/L
NaHL · H <sub>2</sub> O	38 g/L
Na <sub>2</sub> L · 2H <sub>2</sub> O	112 g/L*

\* Estimated value by EPA comptox

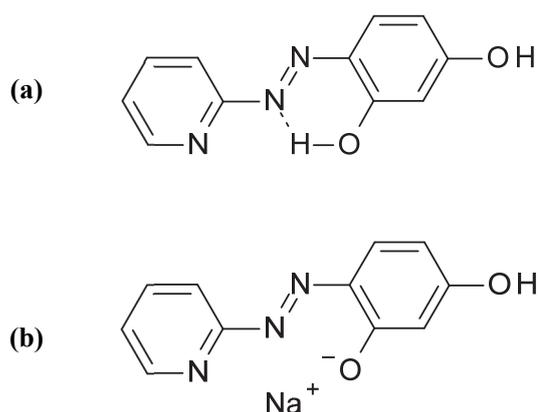


Fig. 2-9 The structure of (a) PAR-free acid<sup>49)</sup> and (b) PAR-mono sodium salt

## (2) PAR 錯体の構造と特性

PAR は非選択性の試薬であるが、モル吸光係数の大きい金属錯体を生成する。その構造<sup>50)</sup>は Fig. 2-10 に示すとおりであり、金属：配位子 1：1 または 1：2 が普通である。金属：配位子 1：1 の代表例は Al<sup>3+</sup>、Bi<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup> であり、1：2 の代表例は、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup> である<sup>51)</sup>。

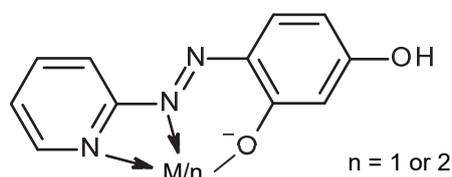


Fig. 2-10 The structure of metal-PAR complex<sup>50)</sup>

NIS 告示法では、Co<sup>2+</sup> と PAR の錯形成反応が用いられているが、Co<sup>2+</sup> は錯形成時に酸化されて Co<sup>3+</sup> になると推定<sup>52)</sup>されており、このときの pH 中性領域における化学反応式は(5)に示すとおりである。



PAR 法を用いた錯形成反応の収率を正確に評価するためには、PAR 溶液にあらかじめ何らかの緩衝液を加え、反応の前後で溶液の pH が変化しないようにする必要がある。ここでは、Co<sup>2+</sup> と PAR の錯形成反応に用いることができる緩衝液としてこれまで報告があるものを、Table 2-5 に示す。

Table 2-5 Buffer types used in PAR solution

Buffer type	pH range	Major literature
Citrate buffer	4 ~ 8	四条と武内 <sup>53)</sup>
Phosphate buffer	8	Inaba <sup>54)</sup>
Phospahte-Borate buffer	6 ~ 10	Yotsuyanagi et al. <sup>55)</sup>
Phosphate-Borate buffer	6.5 ~ 11	山下ら <sup>56)</sup>

安定度定数が 15.71~16.55 と報告されている Co-EDTA に PAR を添加すると Co-PAR が生成し、また Co-PAR 溶液に EDTA を加えてもマスキングされないと報告<sup>52)</sup>されていることから、Co-PAR 錯体の安定度定数は極めて高いと考えられる。このため Table 2-5 に示すような、緩衝液として一般的に用いられているものの大半を、Co<sup>2+</sup>と PAR の錯形成反応に用いることができると考えられる。

### (3) PAR 法によるコバルト逆抽出の試み

PAR 法の応用法として NIS 告示法で示されている、トルエン中の Co-NIS 錯体を PAR 溶液に逆抽出して Co-PAR 錯体を生成させる手法については、Inaba による 1 条件<sup>54)</sup>が報告されているのみであり、錯形成条件に関する知見は限定的である。その手順は、Co-NIS 錯体を抽出した有機相 8 mL に対して、リン酸緩衝液で pH8 に調製した 100 ppm の PAR 溶液 4 mL を加えて 10 分間振とうするというものである。告示法では、PAR 溶液をリン酸緩衝液で pH8 に調製する手順が省かれており、また PAR 濃度や振とう時間も Inaba の手法から変更されているが、これがどのような経緯を経て変更されたものなのか、文献検索を行ったものの判明しなかった。

## 第3章 錯形成反応の最適化による水道水中 NIS 告示法の測定精度の改善

### 3.1 はじめに

NIS 告示法<sup>10)</sup> (Fig. 2-3) の前処理操作は非常に煩雑であり、これに起因する検量線の直線性や結果の再現性に関する問題が多く報告されている。その詳細は、Table 3-1 に示すとおりである。

Table 3-1 Reported major problems and the solutions of NIS-official method

Reported major problems and its solutions	Major literature
When using glassware for colour-development, absorbance value is much lower. It obtain good results by using PP and PE ware.	猪養ら(2009) <sup>28)</sup> , 今井ら(2012) <sup>57)</sup>
Blank value is too high	川口(2009) <sup>58)</sup>
Accuracy of recovery test is low, or abnormal value is detected	
Linearity of calibration curve is not obtained	
Slope of calibration curve is not always constant value	
Repeatability of test is wrong	
SPE column is clogged	
Linearity of calibration curve is not obtained with silica-based SPE column	
To obtain linearity of calibration curve, it is necessary to dehydrate SPE column completely	
When using higher shaking speed of PAR solution than official method, absorbance value is much higher	高(2013) <sup>59)</sup> , 佐久間(2015) <sup>60)</sup>
Higher recovery ratio is obtained by rinsing sample bottle with 20~40% MeOH	三枝と橋渡(2014) <sup>61)</sup>

このうち固相抽出部については、三枝と橋渡<sup>61)</sup>が、固相抽出後の試料容器を 20~40%メタノール溶液を用いて洗い込むことで NIS の試料容器への吸着が低減され、検量線の直線性が高くなることを報告している。一方、発色操作部については、NIS の容器への吸着低減のためポリプロピレン (PP) 製容器を使用すること<sup>28), 57)</sup>や、PAR 溶液の振とう速度の影響<sup>59), 60)</sup>について報告がある。特に、PAR 溶液の振とう速度の影響に関する報告では、告示法で定める振とう時間 (3 分) 内での検討ではあるが、得られる発色強度の差は数十%以上にもなることが示されている。この検討結果は、告示法の発色操作部における収率が低く、PAR 溶液の振とう条件が発色強度のバラツキの主要因であることを示唆している。

発色操作部を構成する 2 つの錯形成反応のうち Co-NCS 法については、三浦ら<sup>62)</sup>は、Co-NCS 溶液のコバルト濃度を高めることで Co-NIS 錯体の生成量が高まることを報告しているが、告示法をはじめとする他の公定法<sup>38-40)</sup>では、三浦らの報告よりコバルト濃度が低く、

コバルト濃度が NIS の錯形成反応にどのような影響を与えるのか、詳細を再検討する必要がある。また、Crabb と Persinger<sup>22)</sup>は、Co-NCS 溶液の pH が Co-NIS 錯体を溶媒抽出する際に著しい影響を与えると述べているが、具体的にどのような影響が生じるのかを含め、これまで詳細な知見は得られていない。

発色操作部を構成するもうひとつの錯形成反応である PAR 法については、コバルトを含む金属イオンと PAR との錯形成について多くの報告<sup>51)</sup>が挙げられている。その応用法として告示法で示されている、トルエン中の Co-NIS 錯体を PAR 溶液に逆抽出して Co-PAR 錯体を生成させる手法については、Inaba による 1 条件<sup>54)</sup>が報告されているのみであり、錯形成条件に関する知見は限定的である。

そこで、本研究では発色操作部における錯体の収率に着目し、収率を高めた錯形成条件を確立することで、検量線の直線性や検査法の正確度が改善されると考え、発色操作部を構成する Co-NCS 法と PAR 法の両法について錯形成反応の諸条件を再検討することとした。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬と器具

#### (1) 試薬

コバルト標準液 (1000 mg/L、JCSS 化学分析用)、PAR (鹿特級)、トルエン (ダイオキシン類分析用)、チオシアン酸アンモニウム (特級)、クエン酸一水和物は、関東化学製を用いた。硝酸コバルト(II)六水和物 (特級)、リン酸水素二ナトリウム (特級)、塩化カリウム (特級)、亜硫酸水素ナトリウム (特級)、メタノール (高速液体クロマトグラフ用)、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム (容量分析用)、1 mol/L 水酸化ナトリウム (容量分析用)、5 mol/L 水酸化ナトリウム (容量分析用) は、富士フィルム和光純薬製を用いた。四ホウ酸ナトリウム十水和物 (特級)、チオシアン酸カリウム (特級) は、ナカライテスク製を用いた。ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル (1000 µg/mL、CRM) は、ジーエルサイエンス製を用いた。精製水は、Milli-Q Advantage (メルク) で製造したものを用いた。

#### (2) 試液

PAR 原液は、PAR 100 mg をメタノール 100 mL に溶かして調製した。

PAR 溶液 (pH 4~8) は、目的の pH 値となるよう任意の量のクエン酸一水和物とリン酸水素二ナトリウムを添加し精製水で溶かした溶液に、PAR 原液を 10 mL 添加し、精製水で 100 mL とした。

Co-PAR 標準液は、コバルト標準液を PAR 溶液で段階的に適宜希釈し、目的の濃度に調製した。

Co-NCS 溶液は、チオシアン酸アンモニウム 22.8 g と塩化カリウム 10 g を添加して精製水で溶かした溶液に、目的の濃度となるよう硝酸コバルト溶液を添加した後、必要に応じて目的の pH 値となるよう水酸化ナトリウム溶液を添加し、精製水で 100 mL とした。

#### (3) 器具

発色操作部において、ガラス製器具を用いると回収率が著しく低下するため、試験管及び

バイアルは PP 製を用い、試液の採取はポリエチレン製チップを用いた。ただし、発色操作時の溶液の分取には、ガラス製パストールピペットを用いた。

固相は、Inertsep mini RP-1（ジーエルサイエンス）を用い、使用前にメタノール 5 mL 及び精製水 5 mL で洗浄した。

#### （４） 装置

HPLC は、1260 Infinity（アジレントテクノロジー）を用いた。カラムは、Asahipak ODP-40 4D（昭和電工）を用い、HPLC 測定条件は、告示法に準じた。pH 計は、MM-60R（東亜 DKK）を用いた。

#### （５） 試験環境

試験は、室温 20 °C の環境にて、各試料 5 併行で実施し、得られた値の平均値を用いた。検量線用標準試料を除き、操作ブランクが検出された試料は、これを差し引いた値を用いた。

### 3.2.2 錯形成条件の検討方法

#### （１） 検討に用いた試験方法

本研究で検討に用いた告示法のフローは、Fig. 2-3 に示すとおりである。この検討に用いた試液の調製は、告示法に従った。告示法では、PAR 溶液による振とうについて「おだやかに 3 分」と記載されているが、これについては上水試験方法<sup>13)</sup>の記載を準用し、120 rpm で水平振とうとした。

Fig. 3-1 に、本法のフローを示す。本法と告示法との主な相違点は、用いる試料量、固相抽出後の洗い込みの有無、Co-NCS 溶液の組成、PAR 溶液の組成と用いる溶液量、PAR 溶液を用いた振とう時の振とう速度と振とう時間である。これらのパラメータを決定するために、PAR 溶液量と PAR 溶液の振とう速度については告示法を用いて検討したが、その他のパラメータについては本法を用いて検討した。

また、告示法では検量線用標準列も試料と同様に固相抽出を行うが、本法では、他の公定法<sup>38-40)</sup>に倣い、検量線用標準列は発色操作のみを行い調製した。

#### （２） Co-PAR 検量線による定量

PAR 溶液量の異なる試料間で、生成した錯体量を比較するために、Co-PAR 標準液を用いて検量線を作成し、得られたコバルト定量値から Co-PAR に換算した値を用いた。

#### （３） 水道水添加試料の調製

水道水添加試料の調製には、岐阜市水道水を用い、テフロン製の試料容器に採取したのち、1%亜硫酸水素ナトリウム溶液を用いて残留塩素を除去した。

#### （４） Co-NCS 法の錯形成条件検討

本法の Co-NCS 溶液を基に、Co-NCS 溶液の組成が Co-NCS 法の錯形成反応に与える影響を検討するため、Co-NCS 溶液のコバルト濃度 (0.005~0.2 mg/L) と pH 値 (3.8~8) について、括弧内に記した範囲内で段階的に変化させた溶液を作成した。この溶液について、0.2 mg/L NIS<sub>ORG</sub>（添え字 ORG は有機層を示す）溶液を標準試料として用い、本法の発色操作のみを行った。

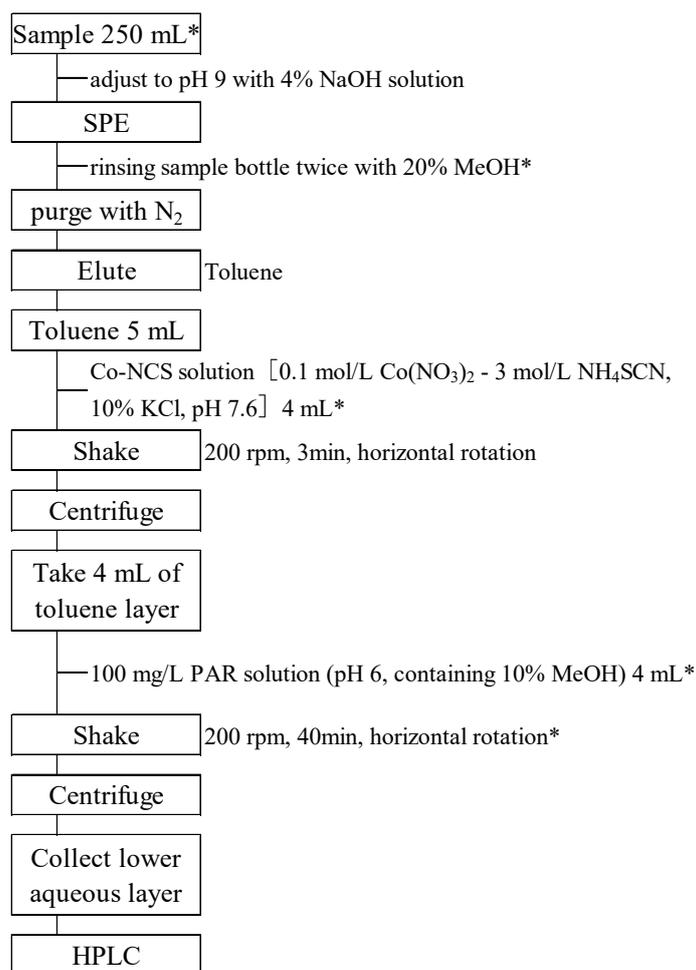


Fig. 3-1 Procedure of this method for the determination of NIS

また、Co-NCS 溶液の組成が検量線に与える影響を検討するため、Co-NCS 溶液のコバルト濃度 (0.005~0.1 mg/L) と pH 値 (5~7.6) について、括弧内に記した範囲内で段階的に変化させた溶液を用い、0.1、0.2、0.5、1、2.5 mg/L の 5 段階に調製した NIS<sub>ORG</sub> 溶液 (水道水中 0.002~0.05 mg/L に相当) を標準試料として、本法の発色操作のみを行い検量線を作成した。

#### (5) PAR 法の錯形成条件検討

告示法における PAR 溶液の振とう条件について検証するため、PAR 溶液量 (0.75~4 mL)、PAR 溶液の振とう速度 (120~200 rpm) 及び振とう時間 (3~30 分) について、括弧内に記した範囲内で段階的に変化させたものを検討した。この検討では、1 mg/L NIS<sub>ORG</sub> 溶液を標準試料として用い、告示法の発色操作のみを行った。

次に、本法における PAR 法の錯形成条件を決定するため、PAR 溶液の pH 値 (4~8) と振とう時間 (3~60 分) について、括弧内に記した範囲内で段階的に変化させたものを検討した。この検討では、本法の定量上限濃度に相当する、2.5 mg/L に調製した NIS<sub>ORG</sub> 溶液 (水

道水中 0.05 mg/L に相当) を標準試料として用い、本法の発色操作のみを行った。

#### (6) 固相抽出に用いる試料容器の材質と容器洗い込み方法の検討

固相抽出操作時の回収率に及ぼす影響として挙げられている、固相抽出時の試料容器洗い込みと、これに影響を与える因子として考えられる試料容器の材質について検討するため、4種類[ガラス、PP、フッ素ガスコーティングポリプロピレン (FCPP) 及びテフロン]の試料容器材質を用い、固相抽出時における試料容器の洗い込み方法を、精製水 20 mL で 2 回、または 20%メタノール溶液 20 mL で 2 回としたときの、基準値濃度 (0.02 mg/L) における水道水添加回収試験を、本法を用いて行った。

#### (7) 水道水添加回収試験と妥当性評価

本法の測定精度と水道水質検査への適用について評価するため、検査員 1 名が、同一の添加試料を 1 日に 5 併行、5 日間の繰り返しによる水道水添加回収試験を行った。NIS の添加濃度は、基準値 (0.02 mg/L) 及び基準値の 1/10 (0.002 mg/L) とした。また、告示法と同じ濃度範囲となるよう 0.1、0.2、0.5、1、2.5 mg/L の 5 段階に調製した NIS<sub>ORG</sub> 溶液 (水道水中 0.002~0.05 mg/L に相当) を標準試料として、本法の発色操作のみを行い検量線を作成し、添加試料の濃度を求めた。

検量線については、本法との比較のため、告示法に従い作成した検量線、告示法の発色操作部のみを行って作成した検量線、及び Co-NCS 法を告示法通りに、PAR 法を本法として発色操作部のみを行った検量線の 3 本を併せて作成した。

#### (8) 水道原水添加回収試験

色度、濁度及び TOC など、特に有機汚濁に関する指標項目について、浄水よりも高値となる場合が多い水道原水への本法の適用について評価するため、水源種別が、表流水、伏流水及び地下水とそれぞれ異なる岐阜県内の浄水場を 3 地点ずつ合計 9 地点選定し、原水を採水した。採水した原水の基礎的性状を知るため、Table 3-2 に示す項目について、告示法を用いて水質検査を行った。

この原水を用いて、検査員 1 名が、同一の添加試料を 1 日に 5 併行とした添加回収試験を行った。NIS の添加濃度は、基準値 (0.02 mg/L) とし、検量線は 3.2.1 (7) と同様の濃度範囲で作成したものをを用いて添加試料の濃度を求めた。

Table 3-2 Inspection items and their measurement method of raw water

Items	Standard method
pH Value	pH meter with glass electrode
Color	Absorption spectrophotometer
Turbidity	Absorption spectrophotometer
TOC	TOC analyzer
Cl <sup>-</sup>	Ion chromatography
Calcium, Magnesium (Hardness)	ICP-MS

### 3.3 結果及び考察

#### 3.3.1 Co-NCS 法の錯形成条件の検討

##### (1) Co-NCS 溶液における緩衝能

Fig.3-2 に示すとおり、Co-NCS 溶液の pH 調整を行うにあたり、あらかじめ滴定曲線を作成し、溶液の特性を調べた。3 mol/L チオシアン酸カリウムを用いて調製した Co-NCS 溶液との比較から、本法で用いた Co-NCS 溶液は、アンモニウムイオン (pKa 9.26) による緩衝能を有していると考えられたため、本法では新たに緩衝液を加えることなく、pH 調整することとした。

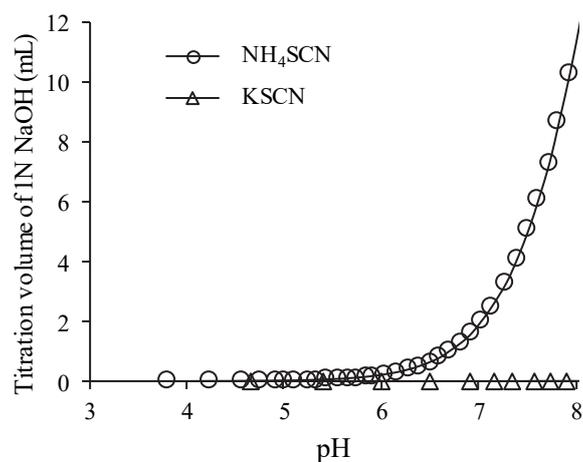


Fig. 3-2 Titration curve of Co-NCS solution (50mL)

##### (2) Co-NCS 溶液における pH 値の検討

0.2 mg/L NIS<sub>ORG</sub> 溶液を用いて、Co-NCS 溶液の pH 値の影響について検討した結果を、Fig.3-3 に示す。0.1 mol/L Co-NCS 溶液 (モル濃度はコバルトの濃度を表す) は、pH 無調整時において弱酸性 (本法の場合、pH 3.8) であり、水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 値を

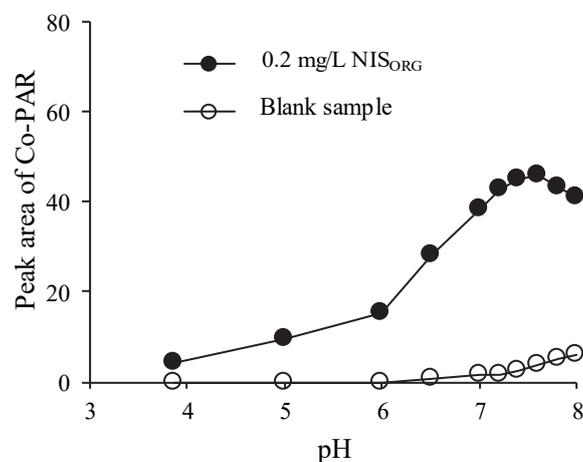


Fig. 3-3 Effect to complexation yields by pH value of 0.1 mol/L Co-NCS solution

高めることで Co-NIS 錯体の生成量が増加し、pH 7.6 付近で極大値となった。中川ら<sup>63)</sup>は、Rb<sup>+</sup>を用いたクラウンエーテルのイオン対抽出時における対陰イオンの影響について検討を行い、Rb<sup>+</sup>が 10%抽出される pH 値は、対陰イオンの pKa に依存し、これより pH 値を高めると錯体の抽出量が増加することを報告している。対陰イオンとして用いた Co(NCS)<sub>4</sub><sup>2-</sup>は、それ自体も錯体であり、生成定数<sup>33)</sup>は、log K<sub>1</sub> = 1.20、log K<sub>2</sub> = 1.69、log K<sub>3</sub> = -0.10、log K<sub>4</sub> = -2.02 と、第 3 次以上は低値である。Co-NCS 溶液の pH 値を高めることで、チオシアン酸の解離が進み、逐次平衡が先に進むと考えられることから、Co-NCS 溶液の pH 値を高めることで Co-NIS 錯体の有機層への抽出定数が高くなったものと推測される。

Co-NCS 溶液の pH 値を 7.6 より更に高くすると、Co-NIS 錯体の生成量は低下していった。このとき、Co-NCS 溶液の色が青紫色から赤紫色へと徐々に変化していくことから、水酸化ナトリウムの添加により Co(NCS)<sub>4</sub><sup>2-</sup>の配位子置換が生じたため、Co-NIS 錯体の生成量が低下したものと推測される。

### (3) Co-NCS 溶液におけるコバルト濃度の検討

Fig. 3-4 に示すとおり、Co-NCS 溶液 (pH 7.6) におけるコバルト濃度の影響について検討した。コバルト濃度を高めると Co-NIS 錯体の生成量が増加し、0.1 mol/L 以上で概ね一定の値となった。

3.1 でも述べたように、三浦ら<sup>62)</sup>は Co-NCS 溶液のコバルト濃度を高めることによる錯生成量の増加を報告しており、これは 30~90 mg/L NIS<sub>ORG</sub> の範囲における検討結果であった。本研究では 0.2 mg/L NIS<sub>ORG</sub> と、三浦らよりも 2 桁以上低い濃度での検討であったが、同様の効果を確認することができた。

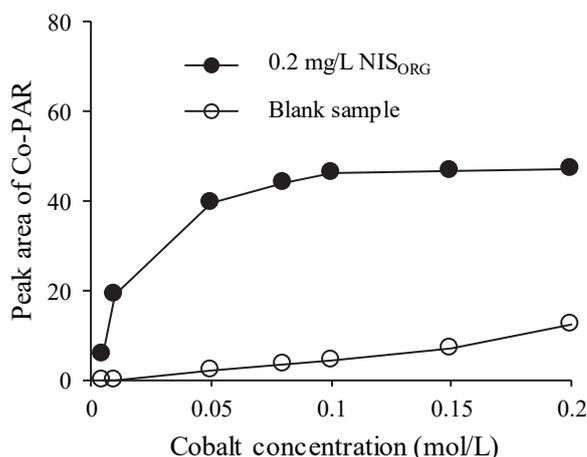


Fig. 3-4 Effect to complexation yields by cobalt concentration of Co-NCS solution (pH 7.6)

### (4) Co-NCS 溶液の組成が検量線に与える影響の検討

Co-NCS 溶液の組成が検量線に与える影響について、pH 値を変化させた場合の検量線を Fig. 3-5 に、コバルト濃度を変化させた場合の検量線を Fig. 3-6 に示す。Fig. 3-5 で

は、直線回帰による一次式  $y = ax + b$  で検量線を作成した結果、いずれも決定係数 ( $R^2$ ) は 0.997 以上であり、pH 値が高くなるほど、検量線の傾き (a)、切片 (b) 及び  $R^2$  値も高くなった。Fig. 3-6 では、直線回帰による一次式  $y = ax + b$  で作成したすべての検量線で  $R^2 = 0.999$  以上となり、コバルト濃度が高くなるほど検量線の傾き (a) も高くなった。

得られた結果から本法では、0.1 mol/L Co-NCS 溶液 (pH 7.6) を用いることとしたが、今回検討したコバルト濃度及び pH 値の範囲では、本法以外にも  $R^2 = 0.997$  以上となる直線性の高い検量線を複数作成することができたことから、本法と異なる Co-NCS 溶液の組成を用いた場合でも、定量法として使用できる可能性が示唆された。

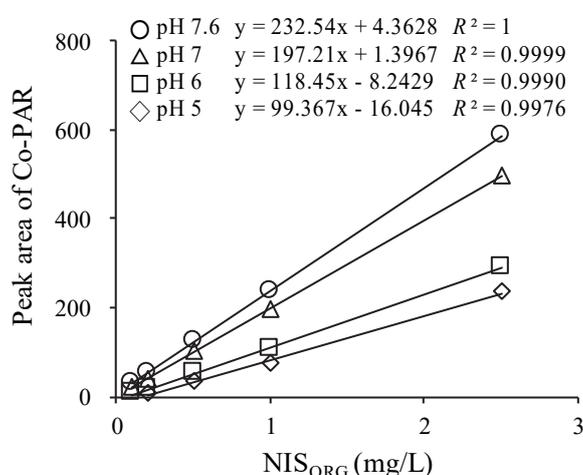


Fig. 3-5 Effect to calibration curve by pH value of 0.1 mol/L Co-NCS solution

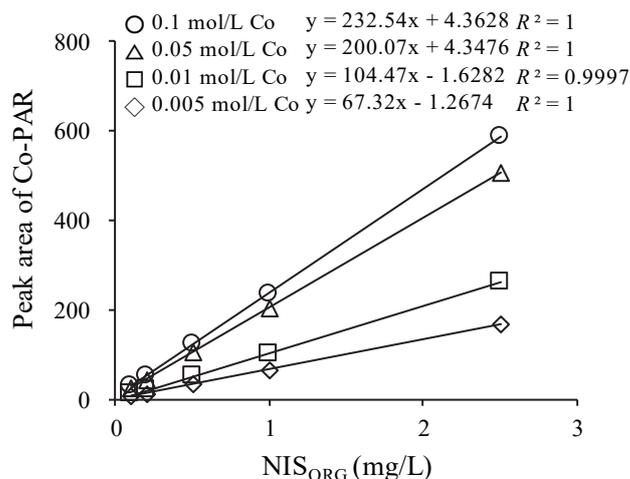


Fig. 3-6 Effect to calibration curve by cobalt concentration of Co-NCS solution (pH 7.6)

### 3.3.2 PAR 法の錯形成条件条件の検討

#### (1) PAR 溶液における析出物の生成

PAR 溶液は、トルエンとの振とうによる析出物の生成が報告<sup>13), 60)</sup>されており、本研究でも同様の析出が確認できた。このうち赤色の析出物は、PAR 溶液 (pH 4~5) の PAR 濃度を 100 mg/L 以上として 1 日以上静置した場合にも生じた。PAR の酸解離定数<sup>45)</sup>は  $pK_{a2}$  5.6 ( $p$ -OH) であり、PAR 濃度を高めると析出量も増加したことから、この析出物は PAR そのものであると考えられた。

また、PAR 溶液とトルエンを振とうし遠心分離した後にも、二層間の水層側に白色の析出物が生じた。この析出物の化学種は不明であったが、PAR 溶液を 10%メタノール溶液とすると析出を抑えることができたため、本法ではこれを用いることとした。

#### (2) 告示法における PAR 溶液の振とう条件の検証

Fig. 3-7 に示すとおり、告示法における PAR 溶液の溶液量、振とう速度、振とう時間の影響について検討した。

検討条件の範囲では、PAR 溶液量は多いほど、振とう速度は高いほど、振とう時間は長いほど、Co-PAR 錯体の生成量が増加した。

PAR 溶液量 0.75 mL 及び振とう時間 3 分とした告示法の振とう条件では、高<sup>59)</sup>及び佐久間<sup>60)</sup>の結果と同様に、告示法で示す振とう速度 120 rpm の場合と比べ、振とう速度を高めることによる Co-PAR 錯体の生成量の増加が確認できた。しかしながら、PAR 溶液量 0.75 mL において得られる錯生成量は、振とう速度を 200 rpm に高め、振とう時間を 30 分まで延ばした場合でも、PAR 溶液量 4 mL を用いた場合と比べて低値であった。このときの操作ブランクについて、振とう直後の状態を観察したところ、PAR 溶液量 0.75 mL と比べて 4 mL の方が、二層の混合により生じた気泡の量が多かったことから、PAR 溶液量 0.75 mL では、振とう時に二層の十分な混合が生じていない可能性が示唆された。

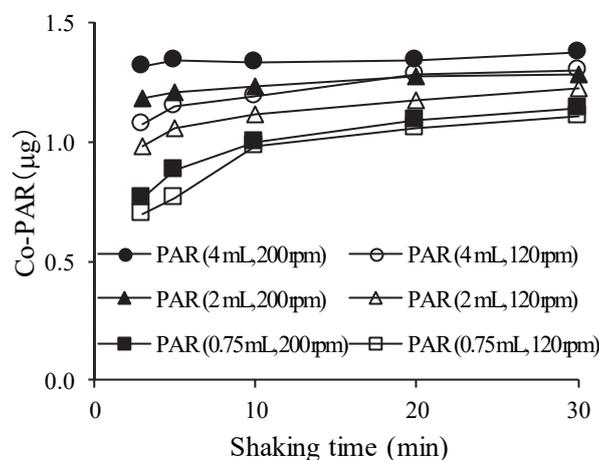


Fig. 3-7 Effect of shaking time and strength for PAR solution in the NIS official method

この検討で得られた結果から、本法の PAR 法における振とう条件として、振とう速度 200 rpm 及び PAR 溶液量 4 mL を用いることとした。

### (3) PAR 溶液の pH 値と振とう時間の検討

Fig. 3-8 に示すとおり、本法を用いて、pH 値を 4、6 及び 8 に調製した PAR 溶液について pH 条件と振とう時間の検討を行った。Co-PAR 錯体の生成量は、振とう時間 30 分以上において一定となったが、pH 8 における生成量は他の条件より少なく、振とう時間を 60 分まで延ばした場合でも生成量は増加しなかった。コバルトを含む金属と PAR との錯形成は、pH 7 以下で起きやすく安定な錯体を形成する<sup>64)</sup>とされており、本研究でも同様に、pH 値による影響が生じたものと考えられる。

また、このとき生成する Co-PAR 錯体  $[\text{Co}^{\text{III}}\text{L}_2]^-$  の酸解離定数<sup>50)</sup>は  $\text{pK}_{\text{a}1}$  3.64、 $\text{pK}_{\text{a}2}$  4.41 であるため、酸性溶液中では  $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{HL})_2]^+$  となる。pH 4 における Co-PAR 錯体の生成量は、pH 6 の場合と同様の結果が得られたものの、用いる器具や HPLC 配管等への Co-PAR 錯体の吸着の恐れを懸念し、条件 pH 4 は用いないこととした。

配位子置換による金属錯体の生成速度は、平衡定数や配位子の種類とは関係がなく、中心金属イオンの種類によって傾向が決まり、本研究で用いたコバルト(II)は反応速度の速い金属である<sup>65)</sup>と考えられている。このため、本研究において、振とう時間の増加に伴い Co-PAR 錯体の生成量が増加した結果は、Co-PAR 錯体の水溶液中における生成速度ではなく、攪拌によりトルエン層中の Co-NIS 錯体が水層に移行し、解離するのに要する時間を示しているものと推測される。

この検討で得られた結果と、3.3.2 (1) で得られた結果から、本法の PAR 法における振とう条件として、PAR 溶液 (pH 6) を用いて 40 分間振とうすることとした。

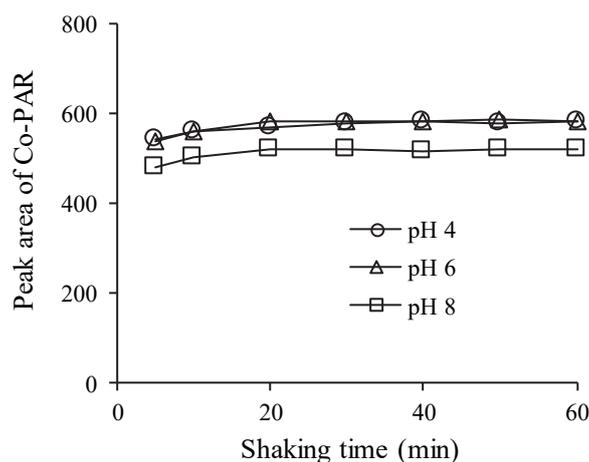


Fig. 3-8 Effect of shaking time and pH value of PAR solution

### 3.3.3 固相抽出に用いる容器の材質と容器洗い込み方法の検討

Fig. 3-9 に示すとおり、4 種類（ガラス、PP、FCPP 及びテフロン）の試料容器材質を用い、固相抽出時における試料容器の洗い込み方法を検討するため、水道水添加回収試験を行った。添加試料の評価はガイドライン<sup>12)</sup>に従い、添加試料の評価項目として設定されている真度と併行精度について評価を行った。

精製水による洗い込みでは、FCPP を除く 3 種類でガイドラインの真度の目標（70～130%）を満たし、すべての結果で併行精度の目標（ $RSD \leq 30\%$ ）を満たした。20%メタノール溶液による洗い込みでは、精製水による洗い込みより真度が高くなり、すべての結果でガイドラインの真度の目標（70～130%）と併行精度の目標（ $\leq 30\%$ ）を満たした。

しかしながら、他の 3 種類と比べて FCPP のみ、両方の結果において真度が 10%以上低い値であった。別途、この容器にトルエン 150 mL を加えて閉栓し、48 時間経過後に容器の外観を確認したが、容器の形状変化は無かったことから、この容器はフッ素ガスコーティングによる耐薬品性を有していると考えられた。回収できなかった NIS は、主に試料容器の器壁に吸着していると考えられることから、FCPP は、他の容器と比べて表面特性に何らかの特異性を有している可能性が推測される。

この検討で得られた結果から、本法では、テフロン製の試料容器を用い、固相抽出時に 20%メタノール溶液で洗い込みを行うこととした。

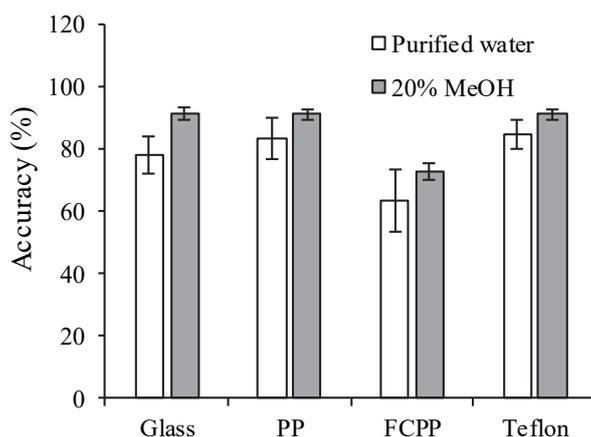


Fig. 3-9 Effect of sampling bottle materials and the rinsing procedure on the accuracy

### 3.3.4 水道水添加回収試験と妥当性評価

#### (1) 検量線の評価

Fig. 3-10 及び Table 3-3 に示すとおり、本法の検量線の評価するため、告示法と同じ定量濃度範囲（水道水中 0.002~0.05 mg/L）にて、本法と告示法を用いて検量線を作成した。検量線の妥当性評価は、ガイドラインに従い、検量線の評価項目として設定されている真度と精度について評価を行った。

検量線の真度については、本法を用いて作成した検量線用標準試料の繰り返し測定（5回）による定量値の平均値を、ガイドラインの目標（調製濃度の 80~120%）と比較した結果、すべての濃度点で目標を満たした。告示法に従い作成した検量線では、検量線下限濃度における真度が 125 % となり、目標を満たさなかった。調製濃度が低くなるほど面積値の減少率も高くなったことから、NIS の試料容器への吸着による影響が表れたものと考えられる。

検量線の精度については、本法を用いて作成した検量線用標準試料の繰り返し測定（5回）による定量値の相対標準偏差（RSD, %）をガイドラインの目標（ $\leq 20\%$ ）と比較した結果、すべての濃度点で目標を満たした。

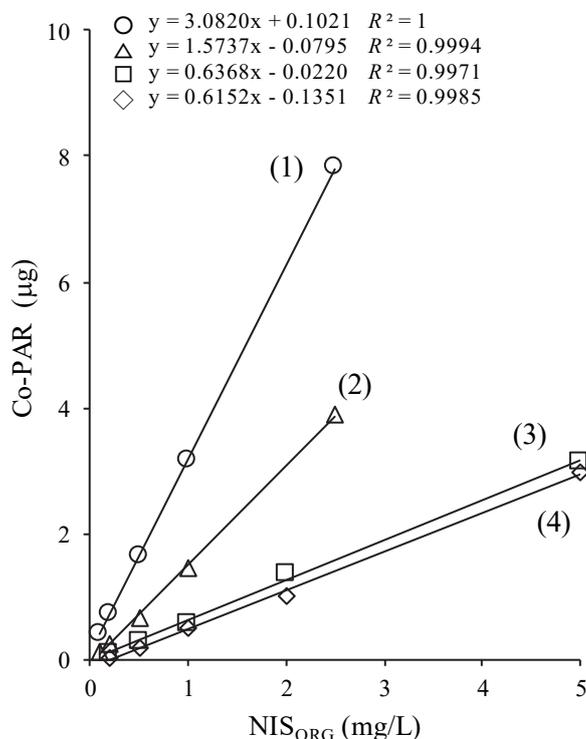


Fig. 3-10 Comparison of calibration curves by NIS-official method and this method

- (1) this method, (2) Co-NCS method : official method, and PAR method : this method, (3) official method (color-development only), (4) official method

**Table 3-3 Evaluation results for calibration curves by NIS-official method and this method**

Sample	this method			official method		
	NIS <sub>ORG</sub> Conc. (mg/L)	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)	NIS <sub>ORG</sub> Conc. (mg/L)	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)
STD 1	0.1	102	1	0.2	125	2
STD 2	0.2	100	1	0.5	100	7
STD 3	0.5	101	1	1	104	5
STD 4	1	99	1	2	93	5
STD 5	2.5	100	1	5	101	3

**(2) 本法と告示法間の錯生成量の比較**

Table 3-4 に示すとおり、3.3.4 (1) で告示法の発色操作部のみを行って作成した検量線の最下点と中央濃度点（水道水中 NIS 濃度として 0.002 mg/L 及び 0.01 mg/L）で得られた面積値を基準とし、Co-PAR 検量線を用いて Co-PAR 錯体の生成量 (µg) とした値を用い、本法及び告示法の各操作部における錯生成量を比較した。

本法では、Co-NCS 法の改良により錯生成量は 2 倍以上高くなり、検量線中央濃度点よりも検量線最下点の方がより高い結果であった。これは、3.3.1 (2) で述べたように、Co-NCS 溶液の pH 値を高めたことによる効果が得られたものと考えられた。PAR 法の改良では、錯生成量が 2.5 倍以上高くなったが、NIS 濃度差による錯生成量の違いはみられなかった。

告示法に従い検量線を作成した場合、標準試料の固相抽出操作における回収率は、検量線最下点で 19%と、著しく低い値となった。これは、告示法の試料量 (500 mL) では容器への試料接液面積が大きく、メタノール溶液による洗い込みも行っていないため、試料容器への吸着による NIS の損失が大きくなったためと考えられた。

これらの結果から、本法では発色操作部における錯体の生成量を告示法と比べて 5 倍以上に高めることができたため、固相抽出に用いる試料量を、告示法の半量 (250 mL) に削減することができた。

**Table 3-4 Comparison of complexation yields by NIS-official method and this method**

NIS <sub>ORG</sub> (mg/L)	Complexation yields ratio*		Recovery ratio of SPE-part of official method (%)
	Co-NCS method	PAR method	
0.2	2.8	2.5	19
1	2.2	2.6	91

\* set the complexation yields of official method (color-development part only) as 1

(3) Co-PAR 錯体の収率の評価

Table 3-5 に示すとおり、本法で作成した検量線の最高濃度点 (2.5 mg/L NIS<sub>ORG</sub>) の面積値から Co-PAR 検量線を用いて Co-PAR 錯体の量 (μg) を求め、NIS 1 μg 当たりの Co-PAR 錯体の生成量 (0.782 μg) を、2.5 で述べた以下の(1)及び(2)で示す化学種の分子式を用いて計算により求めた値と比較した。



また、Amirov ら<sup>33)</sup>は、(2)における NIS を 2 モルとした化学種(3)を用いてソフトウェアによるシミュレーションを行った結果、(2)よりも錯生成定数が高くなるとともに、数値モデルの適切な説明もできると述べているため、本研究もこれに倣い、(3)についても Co-PAR 錯体の生成量を計算により求めた。



本法で得られた結果を、(2) を用いて求めた生成量と比べた場合、その収率は 40%と著しく低い値であったが、本法は検討により錯体の収率を十分に高めたものであることから、(2) が有機層に抽出されたとする可能性は低いと考えられた。また、本法で得られた結果は、(1)を用いて求めた生成量を上回る値であり、(3)を用いて求めた生成量に近い値であったことから、有機層に抽出された NIS 錯体の化学種は、(3)である可能性が示唆された。

クラウンエーテルを用いた有機層へのイオン対抽出定数に関する研究<sup>66-68)</sup>によれば、用いる対陰イオンの構造については、過塩素酸、過マンガン酸などの球状構造物質よりも、平面状構造であるピクリン酸<sup>69)</sup>の方が抽出定数は高く、用いる抽出溶媒の溶解パラメーターが低くなるほど、ピクリン酸との抽出定数の差が大きくなるとされている。本

Table 3-5 Evaluation of Co-PAR complex yields

	chemical species of complex extracted by Co-NCS method	Co-PAR yields (μg / μg NIS)
(1)	$(NIS-NH_4^+)_2 \cdot Co(NCS)_4^{2-}$	0.493
(2)	$(NIS-Co^{2+}) \cdot Co(NCS)_4^{2-}$	1.970
(3)	$[(NIS)_2-Co^{2+}] \cdot Co(NCS)_4^{2-}$	0.985
	this method	0.782

法で用いた  $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$  は球状構造であり、抽出溶媒の溶解パラメーターも低いため、ピクリン酸を用いた場合より抽出定数が低くなると考えられることから、本法で得られた結果も、(3)を用いて求めた生成量よりやや低い値になったものと推測された。

#### (4) 添加試料の評価

得られた結果から構築した本法を用い、検査員 1 名が、同一の添加試料を 1 日に 5 併行、5 日間試験した結果を、Table 3-6 に示す。NIS の添加濃度は、試料量 250 mL に対して、基準値 (0.02 mg/L) 及び基準値の 1/10 (0.002 mg/L) とした。添加試料の妥当性評価は、ガイドラインに従い、添加試料の評価項目として設定されている真度、併行精度及び室内精度について評価を行った。

添加試料の真度については、添加試料 (n = 25) の定量値の平均値を用いて添加濃度に対する比を求め、ガイドラインの目標 (70~130%) と比較した結果、基準値及び基準値の 1/10 のいずれにおいても目標を満たした。

添加試料の併行精度及び室内精度については、各日の添加試料の定量値を用いて精度 (RSD, %) を求め、ガイドラインの目標 (併行精度  $\leq 20\%$ 、室内精度  $\leq 25\%$ ) と比較した結果、基準値及び基準値の 1/10 のいずれにおいても、それぞれの目標を満たした。

Table 3-6 Evaluation of recovery test by this method

Sample	NIS spiked concentration (mg/L)	Accuracy (%)	Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
DWQS value	0.02	89	2	4
1/10 of DWQS value	0.002	85	7	8

#### 3.3.5 水道原水添加回収試験

水源種別が、表流水、伏流水及び地下水とそれぞれ異なる岐阜県内の浄水場各 3 地点ずつ合計 9 地点について原水を採水し、その水質の基礎的性状を検査した結果は、Table 3-7 に示すとおりである。原水の水源種別毎に水質を見た場合、地下水よりも伏流水及び表流水の方が、有機汚濁の指標として挙げられる色度、濁度又は TOC 値がより高値となる傾向にあった。

Table 3-7 Water quality inspection results of raw water

Point name	A		B		C		D		E		F		G		H		I		
	surface water		surface water		surface water		subsoil water		subsoil water		subsoil water		subsoil water		ground water		ground water		
pH	6.7		6.8		7.2		6.8		7.3		7.3		7.3		7.9		7.0		7.2
Color (degree)	5.7		1.8		2.2		0.6		1.0		1.6		<0.5		<0.5		<0.5		<0.5
Turbidity (degree)	0.2		0.2		1.5		0.2		0.2		<0.1		<0.1		0.1		<0.1		<0.1
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	0.8		0.9		1.1		3.3		3.1		4.9		13.5		1.2		1.2		1.5
TOC (mg/L)	1.3		0.5		<0.3		0.4		0.5		0.7		<0.3		<0.3		0.4		<0.3
Hardness (mg/L)	3		4		10		20		27		27		83		13		13		25

この原水を用いて、検査員1名が、同一の添加試料を1日に5併行で試験した結果を、Table 3-8 に示す。添加試料の妥当性評価は、ガイドラインに従い、添加試料の評価項目として設定されている真度及び併行精度について評価を行った。

添加試料の真度については、添加試料 (n = 5) の定量値の平均値を用いて添加濃度に対する比を求め、ガイドラインの目標 (70~130%) と比較した結果、全ての地点において目標を満たした。添加試料の併行精度については、添加試料の定量値を用いて精度 (RSD, %) を求め、ガイドラインの目標 (併行精度  $\leq 20\%$ ) と比較した結果、全ての地点において目標を満たした。

**Table 3-8 Recovery test results of raw water**

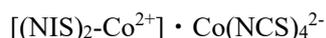
NIS spiked concentration (mg/L)	Point name	Water source	Accuracy (%)	Repeatability (RSD, %)
0.02	A	surface water	99	1
	B	surface water	100	2
	C	surface water	96	2
	D	subsoil water	97	3
	E	subsoil water	96	2
	F	subsoil water	96	1
	G	ground water	94	1
	H	ground water	95	2
	I	ground water	92	4

### 3.4 まとめ

本研究では、非イオン界面活性剤検査法の錯形成反応の収率に着目し、その最適化を検討するとともに、得られた条件から確立した本法を用いて固相抽出条件の検討と水道水添加回収試験を行った結果、以下の知見を得た。

- 1) Co-NCS 法の改良では、0.1 mol/L Co-NCS 溶液 (pH 7.6) を用いることにより、告示法と比べて錯生成量を2倍以上に高めることができた。
- 2) PAR 法の改良では、10%メタノール含有 100 mg/L PAR 溶液 (pH 6) を用いて、200 rpm で40分振とうすることにより、告示法と比べて錯生成量を2.5倍以上に高めることができた。

- 3) 得られた条件から確立した本法では、固相抽出に用いる試料量を、告示法の半量の 250 mL とすることができた。
- 4) 本法の検量線は、真度及び精度ともに、ガイドラインの目標を満たした。一方で、告示法に従い作成した検量線では、検量線下限濃度における真度について、ガイドラインの目標を満たさなかった。
- 5) 本法における Co-PAR 錯体の収率を評価した結果、有機層に抽出された錯体は、下記の化学種である可能性が示唆された。



- 6) 本法を用いて、基準値及び基準値の 1/10 濃度における水道水添加回収試験を行った結果、真度、併行精度及び室内精度のすべてで、ガイドラインの目標を満たした。

基準値の 1/10 を正確に測定するための非イオン界面活性剤測定法としては、告示法より試料量を減らした報告はこれまで無く、告示法より試料量を半量に減らせる本法は、水道水質検査における採水作業や固相抽出時における省力化に貢献できると考えられる。また、本法は告示法より検量線の真度が優れており、水道水質検査にも適用可能と考えられることから、水道水中の非イオン界面活性剤検査法として有用であると考えられる。

## 第4章 CNP 及び CNP-アミノ体の物性と試験法原理

### 4.1 はじめに

CNP は、1970 年代から 1980 年代頃を中心に、水田用除草剤として国内で広く用いられた。現在では、CNP の農薬登録は失効しているものの、CNP 及び CNP の土壌代謝物である CNP-アミノ体は、その毒性や残留性から水質管理目標設定項目に位置付けられている。本章では、CNP 及び CNP-アミノ体の物性などに関連した基礎情報を整理するとともに、水質管理目標設定項目としての設定背景、ならびに CNP の検出に用いられる試験法の原理について述べる。

### 4.2 CNP の物性と環境動態

#### (1) CNP の概要

CNP は、1951 年に三井東圧化学株式会社により見出された水田用除草剤であり、その構造は Fig. 4-1 に示すとおりである。当時の主要な水田用除草剤として用いられていたペンタクロロフェノール (PCP) は、その魚毒性が強く、これに代わる低魚毒性除草剤の開発が課題となっていたためである<sup>70)</sup>。

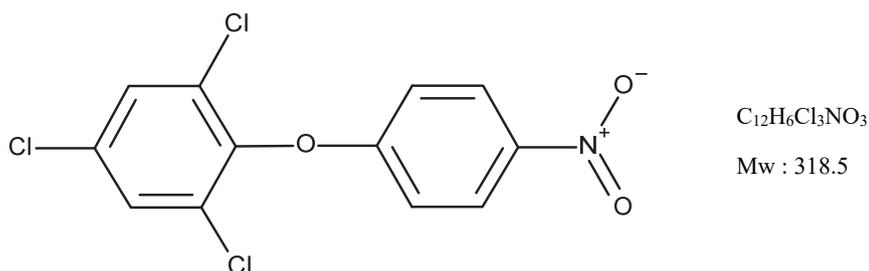


Fig. 4-1 Structure of CNP

PCP 及び CNP 製剤は、水田用除草剤として国内で広く使用され、その原体としての出荷量推移<sup>71)</sup>は Fig. 4-2 に示すとおりである。PCP 製剤は、1960 年代頃から使用が開始されたが、魚毒性回避のため 1970 年代に水田への使用が激減し、1990 年に農薬登録が失効した。CNP 製剤は、1965 年に農薬登録され、以降 PCP 製剤に代わって使用されるようになった。その後、新潟県における CNP 推定暴露量と胆のうがん死亡率との地域的相関が示唆された<sup>19)</sup>ことから、使用の自粛やメーカーによる製品回収があり、1996 年には農薬登録が失効したことで、CNP は姿を消した。2000 年代頃になってから、PCP 及び CNP 製剤中に不純物として含まれていたダイオキシン類の毒性が社会問題となった。国内では、ダイオキシン類に対する環境基準が設定されるなどの法整備が行われたが、土壌中ダイオキシン類の半減期

は25年と推定されており、水田土壤中に広く残留していたこともあってその汚染が問題となった<sup>71)</sup>。

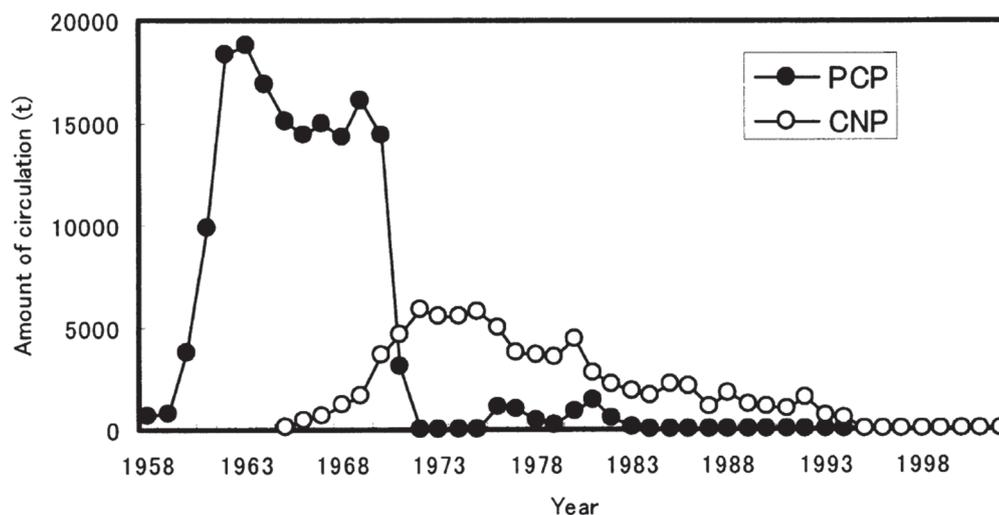


Fig. 4-2 Temporal change of PCP and CNP shipment in Japan

出典：清家ら (2003)<sup>71)</sup>

## (2) CNP の代謝分解と CNP-アミノ体の物性

CNP の土壌代謝物である CNP-アミノ体の構造は、Fig. 4-3 に示すとおりである。水田に散布された CNP の一部は、太陽光による光分解を受けるが、これによる CNP-アミノ体の生成量は極めて少ない。CNP の分解は、土壌の酸化還元電位と相関があり、酸化還元電位の低い土壌ほど CNP-アミノ体への進行が速くなる傾向にある。また、この分解は土壌中に多量に含まれている鉄化合物によるものであると報告されている。土壌中に残留する CNP-アミノ体は、土壌中の有機物と強固に結合しており、比較的安定に存在していると考えられる<sup>72)</sup>。

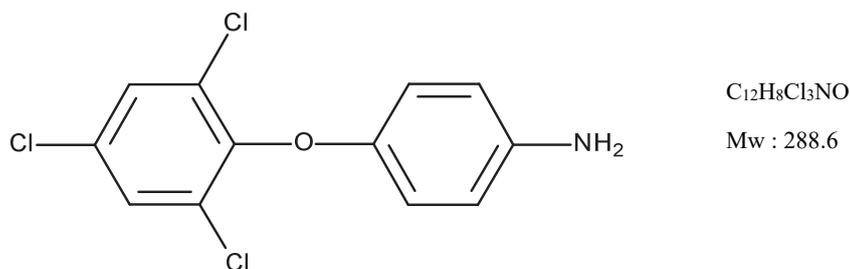


Fig. 4-3 Structure of CNP-amino

### 4.3 CNP の水質管理目標値と設定背景

CNP は、1993 年の水道水質に関する新たな基準の制定において、水質基準を補完する項目（監視項目）として指針値 0.005 mg/L が示された。その後、新潟県における CNP 推定暴露量と胆のうがん死亡率との地域的相関が示唆されたことにより、1994 年に暫定水質管理指針値として 0.0001 mg/L が示された<sup>19)</sup>。2004 年には、主な農薬を水質管理目標設定項目に指定し、総農薬方式による管理が行われることとなったが、CNP は水質管理目標設定項目として引き続き従前の値が目標値として用いられた。

### 4.4 CNP 公定法の概要

CNP の検査法としては、固相抽出ーガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）による一斉分析法（別添方法 5）が厚生労働省から通知<sup>11)</sup>されている。そのフローは Fig. 4-4 に示すとおりである。通知法の原理は、試料水中の CNP を固相抽出し、ジクロロメタンで溶出した液を窒素ガス吹付することで 500 倍濃縮とし、これを GC/MS で測定する方法である。この検査法による定量下限値は、0.0001 mg/L とされている。

CNP の測定値の算出に当たっては、CNP-アミノ体の濃度も測定し、CNP の濃度と CNP-アミノ体の濃度を CNP に換算した濃度を合計して算出することとなっている。

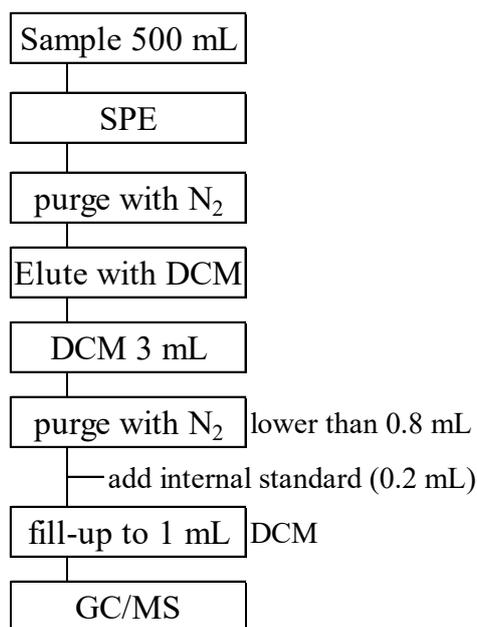
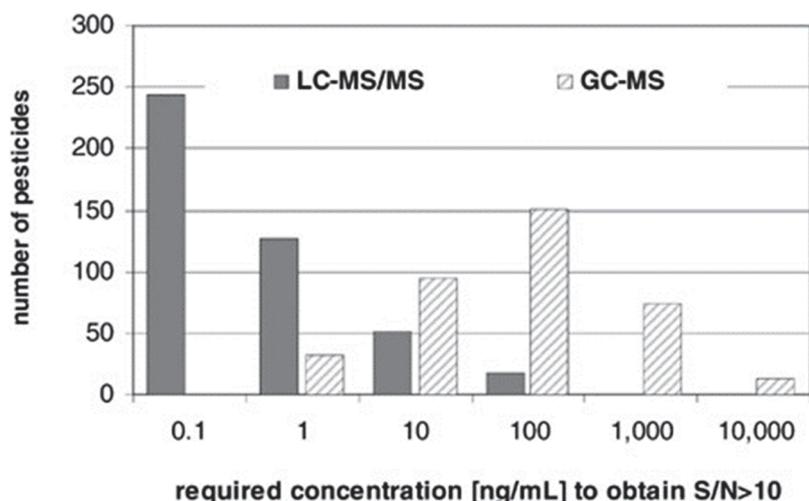


Fig. 4-4 Procedure of CNP official method

### 4.5 質量分析法の概要

#### 4.5.1 はじめに

GC/MS は 1970 年代に日本に導入され、分析に使用されるようになった。その後 GC/MS の性能は目覚ましい発展を遂げたが、装置の取り扱いにはやや熟練を要した。2000 年代に



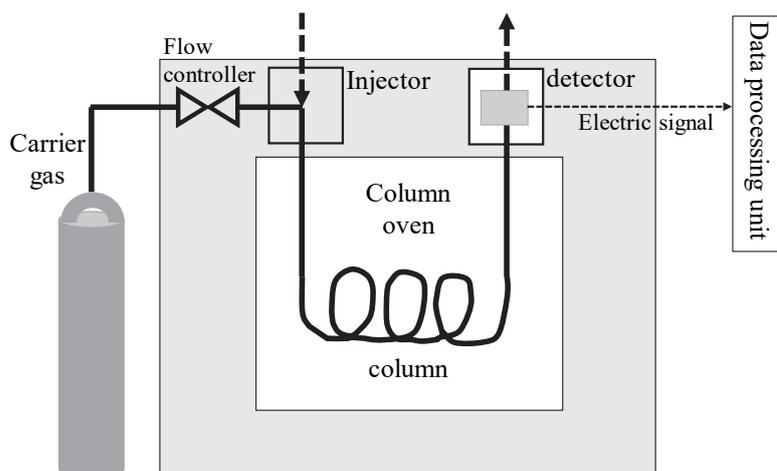
**Fig. 4-5 Number distribution of pesticides based on limit of quantification (LOQ) for 500 pesticides detected with GC-MS and LC-MS/MS**

Source : Alder et al. (2006)<sup>73)</sup>

なつてから、2 段階以上の質量分離を行う液体クロマトグラフー質量分析計 (LC-MS/MS) が導入されたが、その測定感度は Fig. 4-5<sup>73)</sup>に示すとおり GC/MS 法と比べて 100~1000 倍程度高く、また GC/MS 法と比べて幅広い測定対象物質に対応できたことから、食品・水道・製薬・環境・工業分野などにおいて、広く普及した。ここでは、CNP の通知法として用いられている GC/MS 法と、第四章でこれに代わる検査法として用いた LC-MS/MS 法の原理について、比較を交えながら詳細を述べる。

#### 4.5.2 ガスクロマトグラフィー

GC 法は、Fig. 4-6 に示す構成からなる分析装置を用いて、主に気体や液体試料を測定する分析手法である。ここでは、GC の分析対象化合物、分離カラム、検出器について、その概要を述べる。



**Fig. 4-6 Configuration of GC system<sup>74)</sup>**

### (1) GC 分析対象化合物

GC 法において分析対象となる化合物は、下記の条件が満たされる場合となる。

- ・ 大気圧下、400℃程度までで気化する化合物
- ・ GC 内で気化した時に、その測定温度で分解しない化合物
- ・ 気化時に分解しても、定量的に分解物が発生する化合物

このため、気化しない化合物、反応性の高い化合物、熱に不安定な化合物や吸着性の高い化合物は、GC では分析が困難となる。また試料を GC に注入する際は、試料が揮発性の有機溶媒に溶けているか、またはガス状である必要がある<sup>74)</sup>。

### (2) 分離カラム

GC に注入された試料は、キャリアガスによってカラムに導入され、カラム内で成分ごとに分離する。キャリアガスとしては He、N<sub>2</sub>、H<sub>2</sub> がよく用いられるが、キャピラリカラムを用いて分離を行う場合は、一般的に He が用いられる。用いるカラムには、内径 2~4 mm、長さ 0.5~5 m の管内に充填剤を詰めたパックドカラムと、内径 0.1~0.53 mm、長さ 5~100 m の熔融石英ガラス管の内面に液相を塗布したキャピラリカラムの 2 種類がある。カラム内での分離には、カラム内径、カラム長さ、キャリアガスの種類と線速度、固定相の種類と膜厚が影響を与えるため、微量分析を行う場合は、カラム内径が小さくカラム長さも長い場合高理論段数が得られるキャピラリカラムが一般的に用いられる。

キャピラリカラムに用いられる液相の種類とその極性を **Table 4-1** に示す。通常、分析対象化合物の極性に近い性質の液相を選択すると、ピーク形状や分離が良くなる<sup>74)</sup>ため、CNP を GC で測定する場合は、無極性~微極性の液相が塗布されたカラムを用いることが多い。

**Table 4-1 GC column phase types and their polarity**

Polarity	Phase
Nonpolar	100% dimethyl-polysiloxane
	5% diphenyl- and 95% dimethyl-polysiloxane
Mid-polar	6% cyanopropyl-phenyl methyl-polysiloxane
	14% cyanopropyl-phenyl methyl-polysiloxane
	50% cyanopropyl-phenyl methyl-polysiloxane
Polar	Polyethylene glycol

### (3) 検出器

GC で用いられる検出器の種類とその特性を **Table 4-2** に示す。また、各検出器の感度比較を **Fig. 4-7** に示す。用いる検出器は、測定対象化合物の構造によって使い分けられるが、微量分析の際は、定性・定量能力に優れた MS が用いられる。

Table 4-2 Types of GC detector

Detector	Detectable Compound
Thermal conductivity detector (TCD)	All compounds other than the carrier gas
Flame ionization detector (FID)	Organic compounds
Electron capture detector (ECD)	Organic halogen compounds
Flame photometric detector (FPD)	Inorganic and organic sulfur compounds Inorganic and organic phosphorus compounds
Mass Spectrometry (MS)	ionizable compounds by ionization techniques

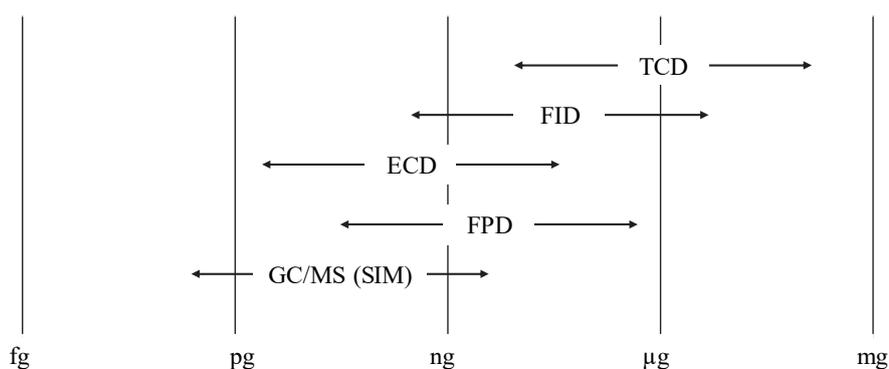


Fig. 4-7 Comparison of sensitivity of GC detectors and GC/MS<sup>75)</sup>

### 4.5.3 液体クロマトグラフィー

HPLC 法は、Fig. 4-8 に示す構成からなる分析装置を用いる。GC 法と異なり、水溶性の試料を直接導入することができるため取り扱う試料との親和性が高く、近年様々な分野で広く普及している。ここでは、HPLC で用いられる分離モード、分離カラム、検出器について、その概要を述べる。

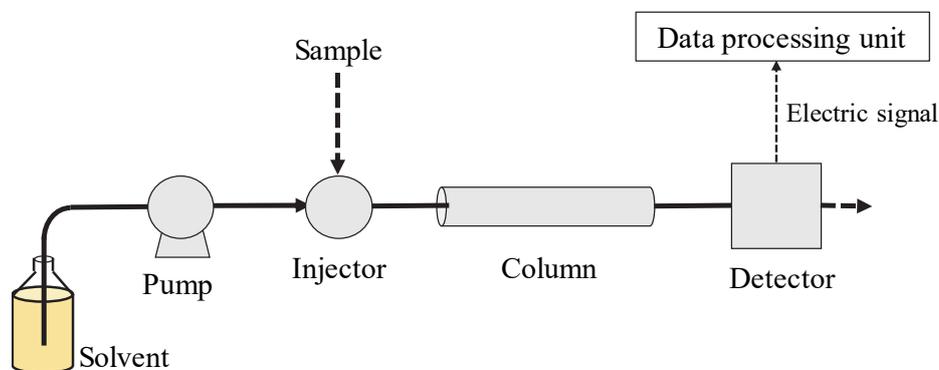


Fig. 4-8 Configuration of HPLC system

**(1) LC の分離モード**

LC 法で用いられる分離モードと分離原理を、**Table 4-3** に示す<sup>76)</sup>。また、各分離モードに適用できる測定対象成分の特性を **Fig. 4-8** に示す。低分子化合物を測定する場合は、測定上の安定性から一般的に、逆相の分離モード (RPLC) が第一に選択される。移動相には、用いる分離モードに対応した有機溶媒と水系溶媒 (緩衝液) が用いられるが、LC/MS の場合は不揮発性の塩を用いることができないため、揮発性の塩であるギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムなどが用いられる。

**Table 4-3 Types and mechanisms of LC separation mode<sup>76)</sup>**

Type of separation mode	Separation mechanism	Target compounds
Reversed-Phase LC (RPLC)	Sample is separated by the solubility to mobile phase and stationary phase by using non-polar stationary phase	Low molecular weight compounds
Normal Phase LC (NPLC)	Polar stationary phase and non-polar mobile phase is used. Sample is separated by the adsorption to the stationary phase.	Hydrophilic compounds
Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	HILIC works same mechanism as NPLC. Organic solvent is use for highly polar compounds, and which is separated by adsorption and partition to stationary phase	Polar compounds
Ion Exchange Chromatography	Sample is separated by the electron affinity of the analyte by using the stationary phase containing ion-exchange functional group	Ionic compounds, inorganic ions
Size Exclusion Chromatography	Sample is separated by molecular sieve of porous particle of stationary phase	High molecular weight compounds

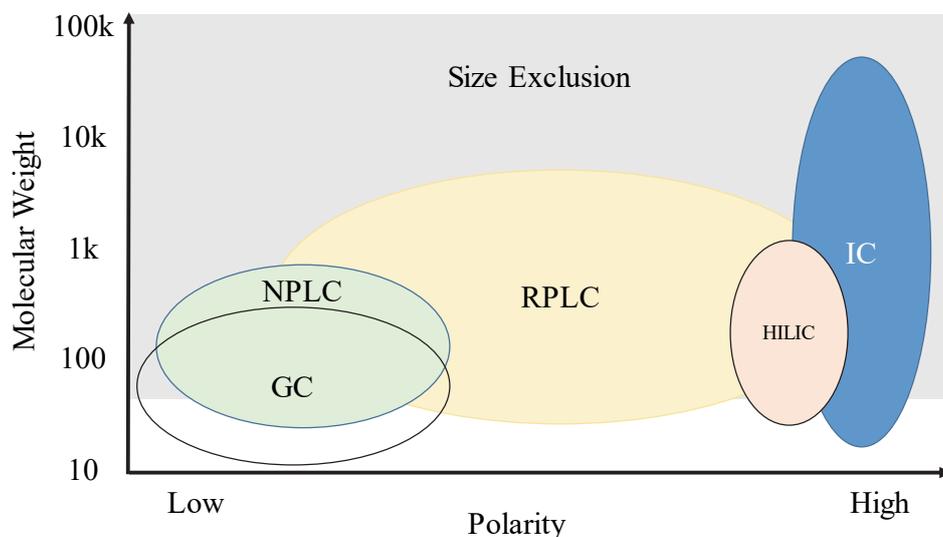


Fig. 4-8 Features and applications of separation modes<sup>77)</sup>

(2) 分離カラム

LC 法で用いられる分離カラムの充填剤の種類とその特徴を Fig. 4-9 に示す。RPLC では、シリカゲル担体にオクタデシルシリル基 (ODS 基、C18 基) を化学結合した充填剤が一般的に用いられる。今日では、小粒径の充填剤と高圧の LC 装置条件を用いて、高効率、高分離かつ高速な測定が行われており、これを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 又は超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) と呼んでいる。

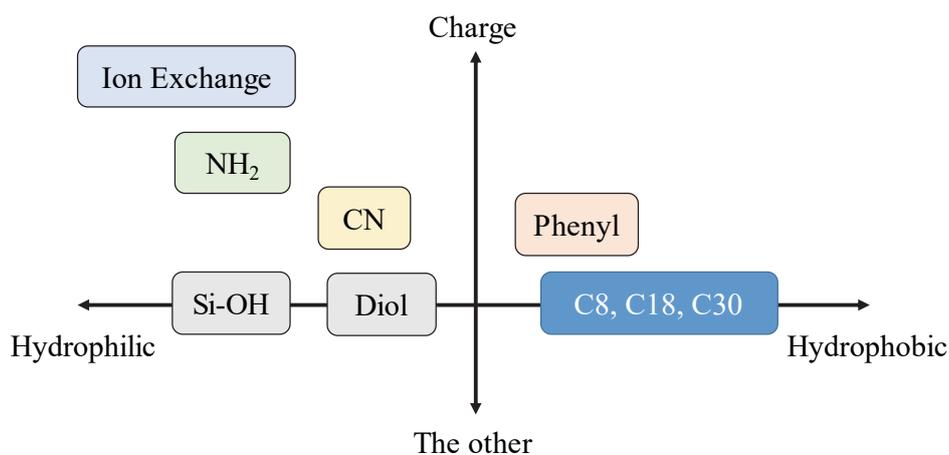


Fig. 4-9 Features of functional group of LC column<sup>77)</sup>

### (3) 検出器

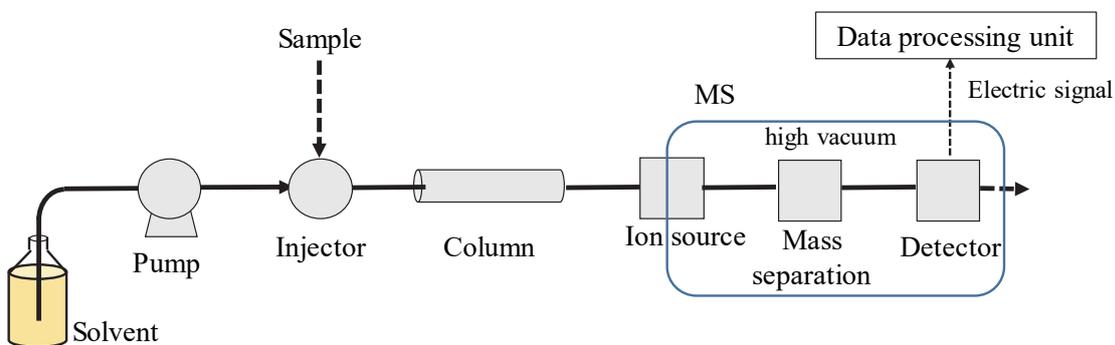
LC で用いられる検出器の種類とその特性を **Table 4-4** に示す。用いる検出器は、測定対象化合物の構造によって使い分けられるが、ppm オーダーでの分析にはコスト面に優れる UVD が用いられることが多い。より高感度かつ高選択性の測定が求められる場面では、MS が用いられる。

**Table 4-4 Types and features of LC detector<sup>77)</sup>**

Detector	Principle of detection	Selectivity	Sensitivity
UV/Vis detector (UVD)	UVD monitors the absorption of light with a specified wavelength	2	3
Fluorescence detector (FLD)	FLD detects fluorescence emitted by the exciting light.	3	4
Conductivity detector (CD)	CD monitors the electric conductivity of column eluent. This detector is mainly used for ion chromatography.	2	3
Mass Spectrometry (MS)	MS detects mass of ionized compounds by ionization techniques	5	5
Refractive index detector (RI)	RI detects the difference of refractive index to eluent	1	1
Evaporative light scattering detector (ELSD)	ELSD atomizes the column eluate, shines light on the resulting particulate components, and detects the resulting scattered light	1	2
Charged Aerosol detector (CAD)	CAD atomizes the column eluent and electrically detects the resulting particulate components treated with corona discharge.	1	3

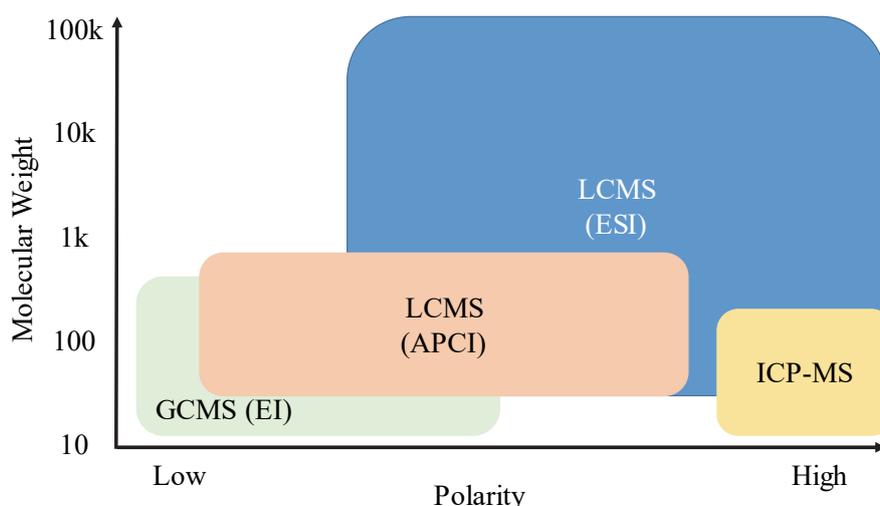
#### 4.5.4 質量分析法の原理と特徴

質量分析法とは、物質をイオン化させて生じた陽イオンまたは陰イオンを、質量/電荷比 ( $m/z$ ) に従って分離し、各々のイオン強度を測定し、定性・定量する方法である。MS 装置の構成は、イオン化部、質量分離部、検出器からなり、その概要は **Fig. 4-9** に示すとおりである。



**Fig. 4-9 Configuration of LC-MS**

MS を用いた測定手法には、Inductively Coupled Plasma MS (ICP-MS)、GC/MS、LC-MS/MS など、様々なイオン化技術と装置があり、その適用範囲は、**Fig. 4-10** に示すとおりである。このうち、イオン化法については、LCMS で広く用いられているエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) と、CNP の検出に用いた大気圧化学イオン化法 (APCI 法) の原理を中心に詳細を述べる。また、質量分離部については、四重極型、磁場型、飛行時間型などの手法が用いられるが、汎用性が高くかつ安価な四重極型が広く普及しているため、これに絞ってその原理の詳細を述べる。



**Fig. 4-10 Features and application of mass spectrometry<sup>77)</sup>**

### (1) ESI 法

ESI によるイオン化法について、概略を述べる。LC のカラムにより分離されたサンプルは溶離液とともにイオン化部に導入され、これに $\pm 3\sim 5\text{kV}$ の高電圧を印加したキャピラリーを通過させることで帯電液滴を生成させる。この帯電液滴は大気圧化で脱溶媒されて小さな液滴となるが、液滴内に存在する分析種のイオン同士の反発や分裂により、気相へと放出される<sup>76)</sup>。これを高真空下に導入して、質量分析する手法である。その模式図は、**Fig. 4-11** に示すとおりである。

ESI 法で観測されるイオン種は、 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{H}]^-$  が主であるが、用いる移動相溶媒の種類により、例えばポジティブモードではアンモニウム付加型 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ やナトリウム付加型 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ などのイオン種が生成することもある。また、ESI 法では、化合物の性質により多数の電荷を持つイオン (多価イオン) が生成することもある。

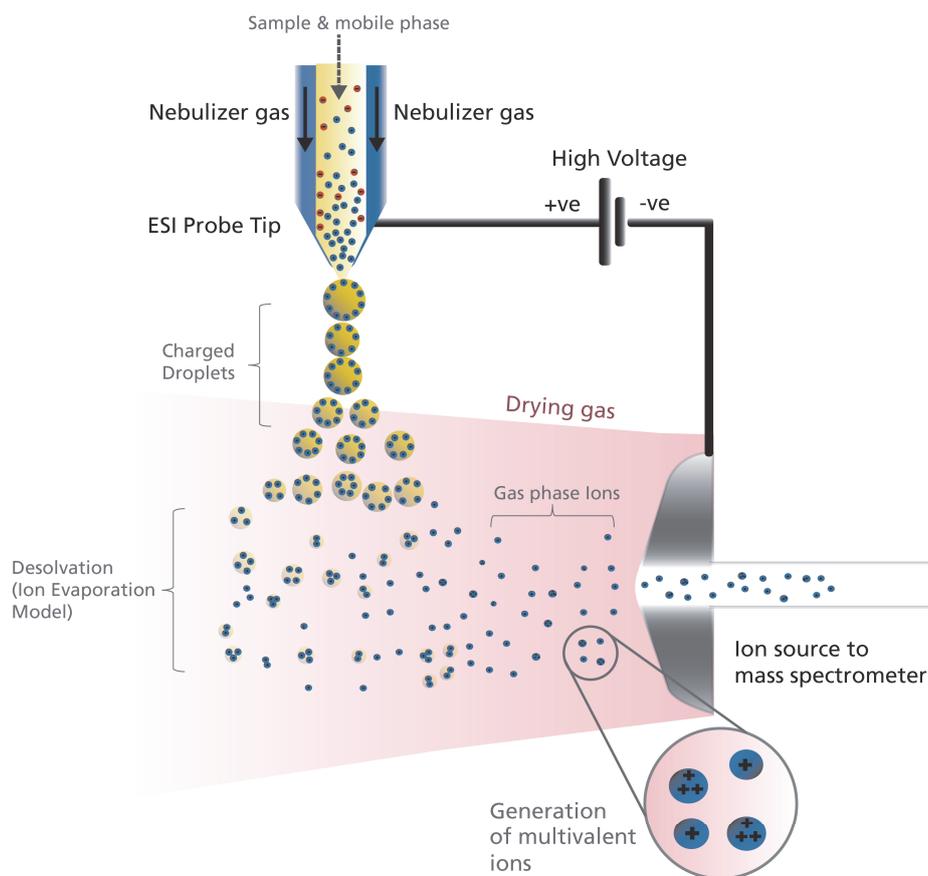


Fig. 4-11 Schematic of the ionization and desolvation process in ESI positive (+) mode

Source : Shimadzu “Fundamental guide to liquid chromatography mass spectrometry”(2018)<sup>76)</sup>

## (2) APCI 法

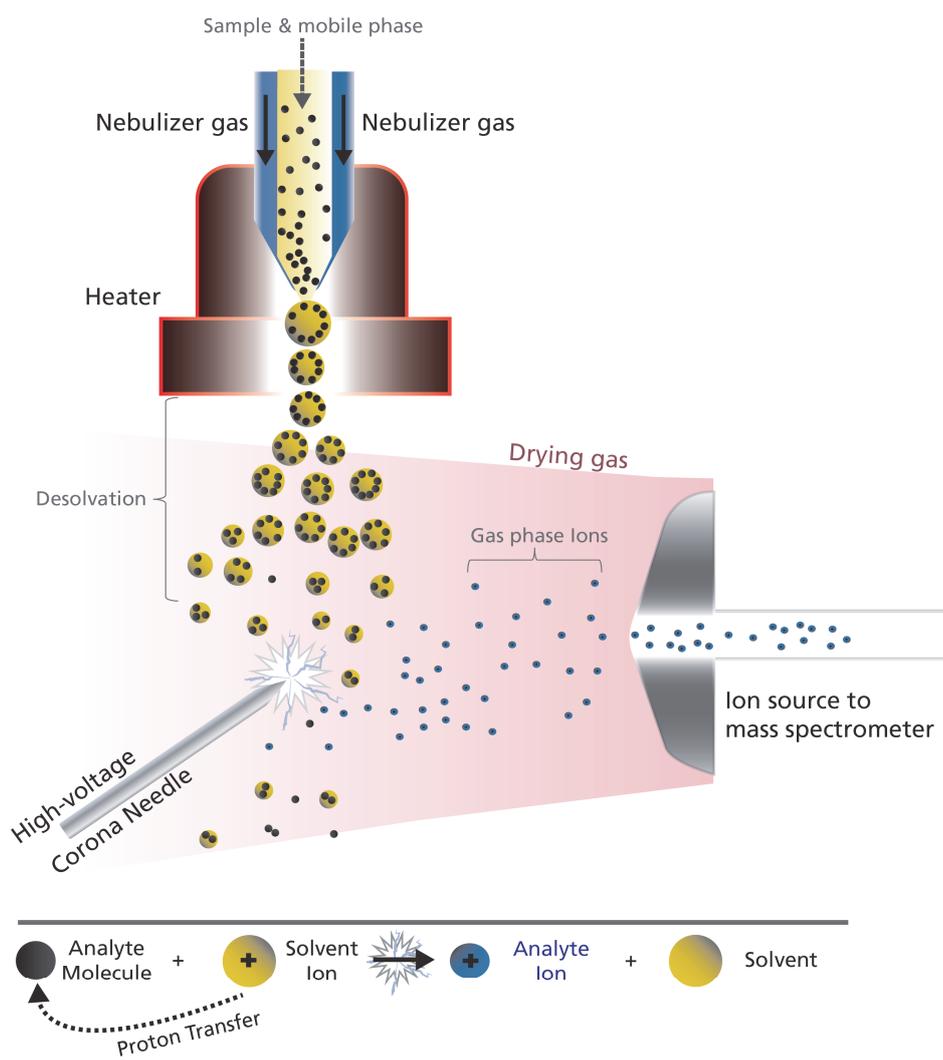
APCI 法は、化学イオン化（イオン-分子反応）を利用したイオン化法である。LC のカラムにより分離されたサンプルは溶離液とともにイオン化部に導入され、脱溶媒ガス(窒素又は空気)で噴霧される。噴霧された領域はヒーターで加熱されているため、ここで脱溶媒が起きる。脱溶媒ガスと気化した溶媒（水、メタノールなど）は、コロナ放電によりイオン化され反応イオン（例えば、 $N_2^+$ 、 $H_3O^+$ ）として働く<sup>78)</sup>。



この時、気化した分析種が存在し、反応イオンよりプロトン親和力が大きければ、反応イオンからイオンを受け取り自らがイオン化される。これを高真空化に導入して、質量分析す

る手法である。その模式図は、**Fig. 4-12** に示すとおりである。なお、大気圧光イオン化 (APPI) 法も、APCI 法とほぼ同様のプロセスでイオン化が生じる、化学イオン化法である。

APCI 法では、ESI 法のような  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等の付加イオンはなく、 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{H}]^-$  の分子イオンが生成されやすい。また、ESI とは異なり、移動相条件 (pH、バッファの有無) にはほとんど影響されないと一般的に言われている。

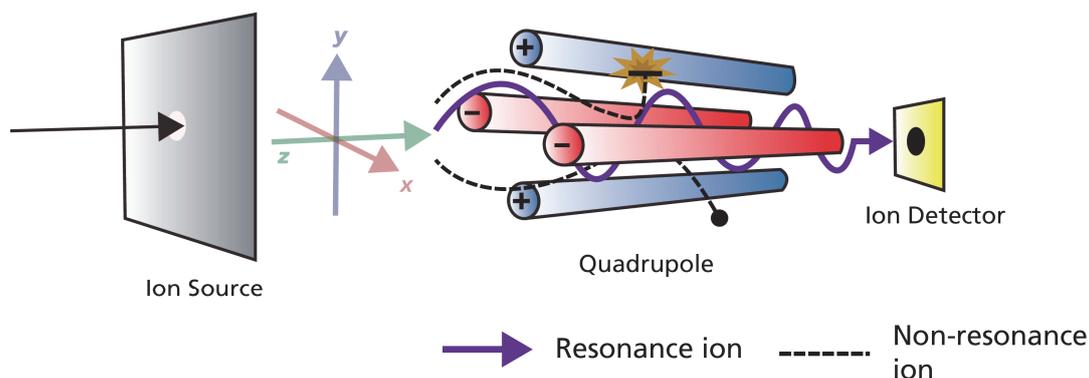


**Fig. 4-12 Schematic of the ion-molecular reaction in APCI**

Source : Shimadzu “Fundamental guide to liquid chromatography mass spectrometry”(2018)<sup>76)</sup>

### (3) 四重極型質量分析計

四重極型質量分析計の構造は、**Fig. 4-13** に示すとおりであり、4本の円柱状の金属ロッドが中心軸から等距離となるように配置された四重極電場を用いて、対向する電極にそれぞれ直流電圧と交流電圧を印加し、各質量特有の周波数を利用して質量のふるいわけを行う。



**Fig. 4-13 Schematic of quadrupole MS**

Source : Shimadzu “Fundamental guide to liquid chromatography mass spectrometry”(2018)<sup>76)</sup>

この装置の特徴としては、

- ・ 比較的安価で操作性が良い
- ・ 分解能は 0.7u 程度だが、定量用途としては十分
- ・ 検量線の直線性が高く、ダイナミックレンジが広い

などが挙げられる<sup>81)</sup>。

トリプル四重極型質量分析計とは、**Fig. 4-14** に示すとおり、四重極型の質量分離部を2か所持っている装置の事であり、今日、定量用途で広く用いられている。Q1部で特定の質量を選択し、そのイオンにガスを衝突させることでイオンを開裂させ、生じたイオン群をQ3部でさらに質量選択することで、より選択性の高いイオン検出が可能となる。

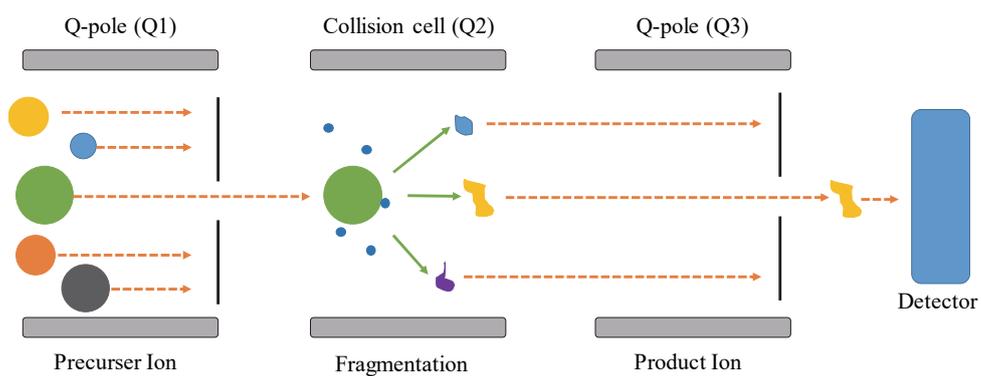


Fig. 4-14 Principle of triple quadrupole MS<sup>79)</sup>

## 第5章 固相抽出-LC-APCI-MS/MSによる水道水中のCNP及びCNP-アミノ体の測定手法の検討

### 5.1 はじめに

CNPは、水質管理目標設定項目の農薬類として、目標値0.0001 mg/Lが定められており、その標準検査法として固相抽出-GC/MS法（別添方法5）が、厚生労働省から通知されている<sup>11)</sup>。農薬類の水質検査の実施にあたっては、原則として目標値の1/100まで測定することとガイドライン<sup>12)</sup>に示されている真度及び精度を確保することが求められているが、CNP及びCNP-アミノ体については、別添方法5における定量下限値（0.0001 mg/L）が目標値と同じ濃度であり、かつ、必要な真度、精度又は定量下限を確保できない可能性が高い「参考法」に位置付けられている。これまでのところ、別添方法5よりも低い定量下限値を達成できるCNP及びCNP-アミノ体検査法は示されておらず、目標値の1/100まで測定できる検査法の開発が望まれている。

CNPの検査法は、別添方法20-2として2018年に厚生労働省から通知された<sup>80)</sup>、エレクトロスプレーイオン化法（ESI法）による直接導入-LC-MS/MS一斉分析法の開発時に検討が行われたが<sup>81)</sup>、標準検査法の設定には至らなかった。その要因として、CNPの分子構造内に、ESI法により高いイオン化効率を得られる官能基を有していないことが挙げられる。一方で、CNPのような低極性有機塩素化合物をLCMSで測定しようとした場合、大気圧化学イオン化法（APCI法）のネガティブモード（以降、APCI法ネガティブモードと記す）が選択される場合もある。APCI法は化学イオン化法に基づいており、加熱気化させた試料を、大気圧コロナ放電内で、移動相や大気成分に由来する反応イオンとのイオン分子反応によりイオン化させる手法である<sup>82)</sup>。APCI法ネガティブモードでは一般的に、高いプロトン親和力を有する $\text{HO}^-$ や $\text{O}_2^-$ が主な反応イオンとなり、試料の脱プロトン化を促すため、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ が生じやすくなる。芳香族有機塩素化合物の場合は、塩素の置換位置にも依るが、Dzidicら<sup>83)</sup>により、*p*-クロロニトロベンゼンやヘキサクロロベンゼンにおいて $[\text{M}-\text{Cl}+\text{O}]^-$ 型のフェノキシドイオンの生成事例が報告されている。他にも、APCI法ネガティブモードにより $[\text{M}-\text{Cl}+\text{O}]^-$ が生成する事例として、テトラジホン<sup>84)</sup>、クロルピリホス<sup>85)</sup>やイマザリル<sup>86)</sup>等がこれまで挙げられている。CNPについても同様に、 $[\text{M}-\text{Cl}+\text{O}]^-$ の生成が報告<sup>87)</sup>されているが、その生成効率に影響を与えるLC-MS/MSの最適な測定条件については、これまで詳細な知見は得られていない。

CNP-アミノ体の検査法は、CNPと同様に、ESI法による直接導入-LC-MS/MS一斉分析法の開発時に検討が行われたが<sup>81)</sup>、得られるピーク強度が低いため、標準検査法の設定には至らなかった。CNP-アミノ体は、その構造内にアミノ基を有するため、ESI法のポジティブモードによるイオン化効率は高いと考えられるが、試料水を濃縮せずにLC-MS/MSに直接導入した場合、目標値の1/100として求められる定量下限値（0.001 µg/L）が極めて低いため、必要な感度が得られなかったものと推測される。これを、APCI法のポジティブモ

ード（以降、APCI法ポジティブモードと記す）で測定しようとした場合、これまで測定報告は無いものの、容易にイオン化しESI法と同程度の感度が得られると考えられるが、上述のように試料水を濃縮せずにLC-MS/MSに直接導入した場合、必要な感度が得られない可能性が高い。

そこで本研究では、試料水の前処理として固相抽出による濃縮操作を行うこととし、CNPはAPCI法ネガティブモードによるフェノキシドイオン生成を用い、またCNP-アミノ体はAPCI法ポジティブモードを用いて、目標値の1/100まで測定可能な固相抽出-LC-APCI-MS/MSによるCNP及びCNP-アミノ体の一斉分析法を検討することとした。そして、検討の結果得られたLC-MS/MS条件及び固相抽出条件から構築した試験法（本法）を用いて水道水添加回収試験を行い、本法の妥当性について評価を行ったので、これを報告する。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 試薬と標準液

#### (1) 試薬

メタノール（LC/MS用）、アセトニトリル（LC/MS用）、エタノール（高速液体クロマトグラフィー用）、アセトン（高速液体クロマトグラフィー用）、は、関東化学製を用いた。酢酸（高速液体クロマトグラフ用）、アスコルビン酸ナトリウム（特級）、CNP標準品（残留農薬試験用）、CNP-アミノ標準物質（TraceSure）は、富士フィルム和光純薬製を用いた。ギ酸（LC/MS用）、ギ酸アンモニウム（ $\text{NH}_4\text{FA}$ 、LC/MS用）は、ハネウェル・フルカ製を用いた。10M酢酸アンモニウム（ $\text{NH}_4\text{Ac}$ 、遺伝子工学研究用）は、ニッポンジーン製を用いた。CNP- $\text{d}_4$ は、林純薬製を用いた。精製水は、Milli-Q Advantage（メルク）で製造したものをを用いた。

#### (2) 標準液の調製法と検量線の作成方法

CNP、CNP-アミノ体及びCNP- $\text{d}_4$ の各標準品を精密に量りとり、アセトニトリルで各1mg/mLの標準原液を調製した。CNP及びCNP-アミノ体の混合標準液の調製は、各標準原液をアセトニトリルで段階的に希釈して行った。

検量線については、内部標準物質としてCNP- $\text{d}_4$ を1 $\mu\text{g/L}$ 含む、0.05、0.1、0.2、0.5、1及び2 $\mu\text{g/L}$ の6段階に調製したCNP及びCNP-アミノ体の60%アセトニトリル溶液を標準試料とした。CNP-アミノ体については外部標準法で、またCNPについては内部標準物質としてCNP- $\text{d}_4$ を用いた内部標準法で、直線回帰による一次式を用いて検量線作成した。

### 5.2.2 LC-MS/MS測定条件の検討

#### (1) LC-MS/MS測定の基本条件

LC-MS/MSは、1260 Infinity II Bio-Inert（アジレントテクノロジー）及びTriple Quad 4500（サイエックス）からなる構成を用いた。

LC移動相は、メタノールと水を90:10で混合したものを、恒温槽温度40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速0.5 mL/minでアイソクラティック分析とした。カラムは、Capcellpak C18 MGIII 3.0 mm $\times$ 150 mm、3 $\mu\text{m}$ （大阪ソーダ）を用い、試料注入量は30 $\mu\text{L}$ とした。

MS/MS測定は、APCI法ポジティブモード（測定対象物質：CNP-アミノ体）及びAPCI

法ネガティブモード（測定対象物質：CNP及びCNP-d<sub>4</sub>）の交互取込で行った。イオン源の各パラメータは、ターボヒーター温度400℃、イオンソースガス1圧力20 psi、カーテングス圧力30 psi、プローブ電圧4.5 kv及びコロナ放電電流3 µAを用いた。また、LC-MS/MS測定の際に、試料由来の夾雑物がMSに導入されないよう、Triple Quad 4500内蔵の六方バルブを用いて、測定時間0～2分のカラム溶出液をドレインに排液した。

本研究では、上記のLC-MS/MS測定条件を用いて検討及び水道水添加回収試験を行ったが、LC部及びMS/MS部におけるそれぞれの詳細な条件検討時は、このパラメータを一部変化させて検討を行っており、その内容については以下に記すとおりである。

### （2）MS/MS モニターイオンの検討

メタノールで希釈した各農薬の個別標準液を、Triple Quad 4500内蔵のシリンジポンプを用いてMSに直接導入し、スキャン測定した。得られたスペクトルからモニターイオンを選択し、選択反応モニタリング（SRM）によるイオン化条件を検討した。

### （3）LC 移動相条件の検討

APCI法ネガティブモードで用いるLC移動相について、有機溶媒の種類を決定するため、4種類（メタノール、エタノール、アセトニトリル及びアセトン）の有機溶媒を用い、CNP-d<sub>4</sub>溶液（10 µg/L）を注入した時に得られる強度を比較した。次に、LC移動相の有機溶媒としてメタノールを用いたときの水系溶媒の種類を決定するため、5種類（水、0.2% ギ酸、0.2% 酢酸、2 mM NH<sub>4</sub>Ac、2 mM NH<sub>4</sub>FA）の水系溶媒を用いて、CNP-d<sub>4</sub>溶液（10 µg/L）を注入した時に得られる強度を比較した。測定はすべて各試料5併行で実施し、得られた値の平均値を用いた。

### （4）移動相添加物の干渉による影響の検討

LCのカラムを取り外したフローインジェクション分析（FIA）によりスキャン測定（*m/z* 10～150）を行い、観測されるバックグラウンドイオンの強度を比較した。検討には、LC移動相として有機溶媒にはメタノールを、水系溶媒には5種類（水、0.2% ギ酸、0.2% 酢酸、2 mM NH<sub>4</sub>Ac、2 mM NH<sub>4</sub>FA）を用いた。次に、LCのカラムを装着し、LC移動相の有機溶媒としてメタノールを用いたときの、4種類（0.02～0.2% ギ酸、0.02～0.2% 酢酸、2～20 mM NH<sub>4</sub>Ac、2～20 mM NH<sub>4</sub>FA）の水系溶媒について、括弧内に記した範囲内で段階的に添加物濃度を変化させた溶液を用いて、CNP-d<sub>4</sub>溶液（10 µg/L）を注入した時に得られる相対強度と、*m/z* 77 > 60（確認イオンとして *m/z* 78 > 61 を使用）で得られる強度を比較した。なお、CNP-d<sub>4</sub>の相対強度は、水系溶媒として水を用いた場合に得られた強度を100として求めた。

## 5.2.3 試験操作法

試料水の調製には岐阜市の水道水を用い、これをガラス製容器に採取した後、アスコルビン酸ナトリウムを添加して残留塩素を除去した。

固相カラムはInertsep mini RP-1（ジーエルサイエンス製）を用い、アセトニトリル5 mL及び精製水5 mLでそれぞれコンディショニングした。これに、サロゲートとしてCNP-d<sub>4</sub>

を5 ng 添加した検水 500 mL を流速 10 mL/min で通水した後、固相抽出に用いた試料容器を10% アセトニトリル溶液 20 mL で2 回洗い込み、それぞれ固相に通水した。次いで、固相カラムを窒素ガスで10 分間通気乾燥させた後、通水方向の逆からアセトニトリル 3 mL で溶出させ、これに精製水を加えて5 mL とした。この溶液の一部をガラスバイアルに採り、

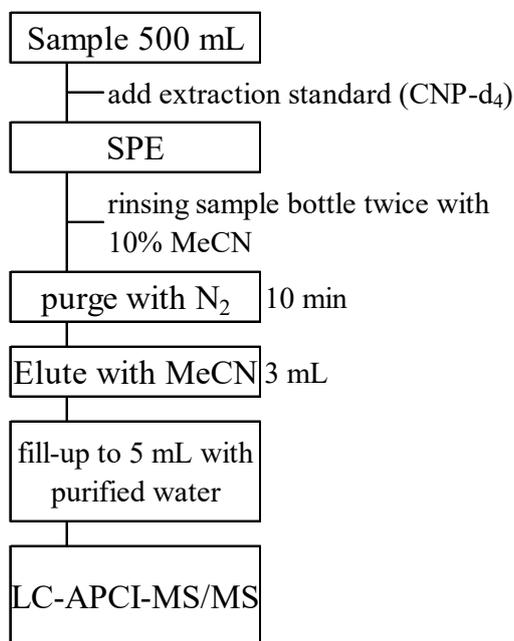


Fig. 5-1 Procedure of this method

LC-MS/MS 測定に供した。本法のフローを、Fig. 5-1 に示す。

#### 5.2.4 固相抽出時の容器洗い込み方法の検討

固相抽出時に用いる試料容器（ガラス製）への測定対象物質の吸着による影響を検討するため、固相抽出時における試料容器の洗い込み方法を、精製水又は10～30% アセトニトリル溶液 20 mL で2 回としたときの、目標値の1/10 濃度（0.01 µg/L）における水道水添加回収試験を、各試料5 併行で行った。CNP 及びCNP-アミノ体の回収率は外部標準法で求め、得られた値の平均値を用いた。

#### 5.2.5 水道水添加回収試験と妥当性評価

本法の測定精度と水道水質検査への適用について評価するため、検査員1 名が、同一の添加試料を1 日に5 併行、5 日間の繰り返しによる水道水添加回収試験を行った。CNP 及びCNP-アミノ体の添加濃度は、目標値の1/10（0.01 µg/L）及び目標値の1/100（0.001 µg/L）とした。

### 5.3 結果及び考察

#### 5.3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

##### (1) MS/MS モニターイオンの検討

Fig. 5-2 に示すとおり、塩素数3 のCNP 及びCNP-d<sub>4</sub> を、APCI 法ネガティブモードによ

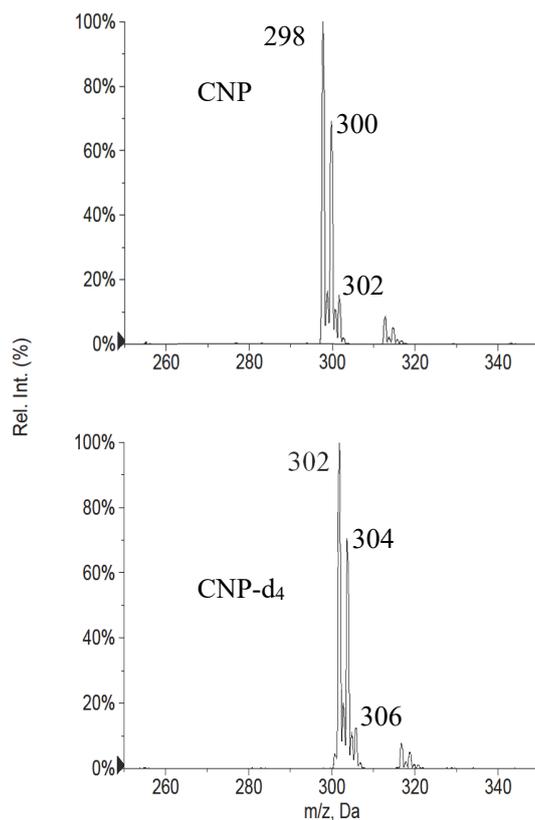


Fig. 5-2 Spectrum of CNP and CNP-d<sub>4</sub>

リスキャン測定したところ、得られたイオンの塩素同位体パターンから、イオンに含まれる塩素数は2であると推定された。最も高い強度が得られた CNP イオンの質量数 ( $m/z$  298) も中村の報告<sup>87)</sup>と一致していたことから、 $[M - Cl + O]^-$ 型のフェノキシドイオンが生成したものと考えられた。この結果から、CNP の Q1 モニターイオンは  $m/z$  298 (定量) 及び 300 (確認) を用いることとしたが、CNP-d<sub>4</sub> については、カラムから共溶出する CNP の影響を避けるため、Q1 モニターイオンは  $m/z$  304 (定量) 及び 306 (確認) を用いることとした。次いで Fig. 5-3 に示すとおり、Q1 モニターイオンを選択したときの、CNP 及び CNP-d<sub>4</sub> のプロダクトイオンスキャンを行ったところ、それぞれ  $m/z$  176 及び 178 に高い強度が得られたため、これを Q3 モニターイオンとした。

Table 5-1 に示すとおり、CNP-アミノ体についても APCI 法ポジティブモードで検討を行ったところ、得られたモニターイオンの組み合わせは、小林ら<sup>81)</sup>が ESI 法で検討した結果と同様であった。

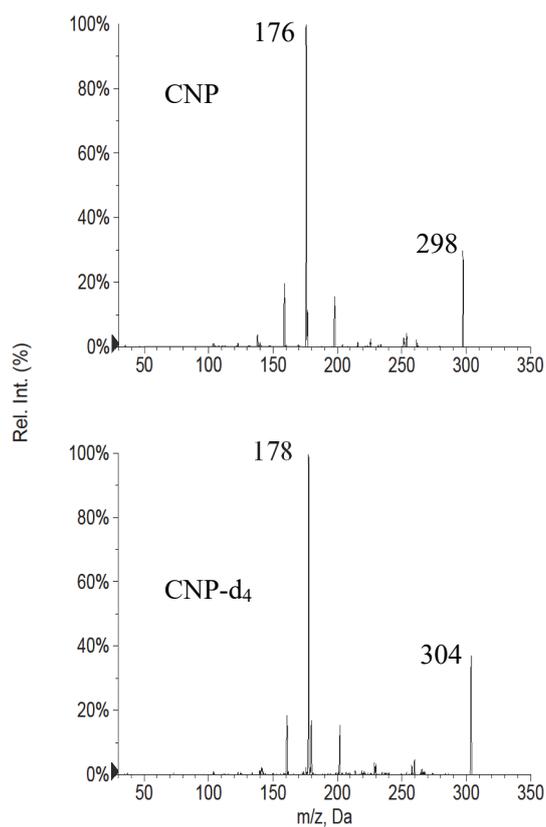


Fig. 5-3 Product ion spectrum of CNP ( $m/z$  298) and CNP-d<sub>4</sub> ( $m/z$  304)

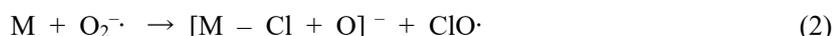
Table 5-1 MS/MS transition of target compounds

Compound	APCI Ionization mode	MS/MS transition ( $m/z$ )	
		Quantitation	Confirmation
CNP-amino	positive	288 > 93	290 > 93
CNP	negative	298 > 176	300 > 178
CNP-d <sub>4</sub>	negative	304 > 178	306 > 180

## (2) LC移動相条件の検討

APCI法ネガティブモードにおいて、LC移動相に用いる有機溶媒の種類がCNP-d<sub>4</sub>の強度に与える影響を検討した結果、Table 5-2に示すとおり、最も気相酸性度<sup>88)</sup>の低い ( $\Delta G_{\text{acid}}$  値が高い) メタノールを用いた場合に最も高いCNP-d<sub>4</sub>強度が得られたため、移動相有機溶媒としてこれを用いることとした。APCI法ネガティブモードにおいては、用いる溶媒の気相酸性度が高いと、反応イオンである  $\text{O}_2^-$  が中性化され、 $\text{O}_2^-$  と測定対象物質との電荷交換反応や置換反応が阻害される<sup>89)</sup>ことから、この影響が生じたものと考えられる。

また、CNPはAPCI法ネガティブモードにおいて、 $\text{O}_2^-$  との置換反応によりフェノキシドイオンが生成すると推測される<sup>83), 90)</sup>。



これに、アセトンやアセトニトリルのような正の電子親和力を有する物質を移動相溶媒として用いた場合、これらが電子を捕獲してしまうことにより  $\text{O}_2^-$  や  $\text{HO}^-$  等の反応イオン生成が阻害されることで、測定対象物質のイオン化阻害が生じたものと考えられる。

Table 5-2 Effect of the different organic solvent types in mobile phase on CNP-d<sub>4</sub> intensity

Solvent	Electron affinity (eV)	$\Delta G_{\text{acid}}$ (kJ/mol)	Relative Intensity of CNP-d <sub>4</sub> (%)
Methanol	—	1565	100
Ethanol	—	1551	86
Acetone	0.0015	1514	14
MeCN	0.011	1528	10

Note : Gas phase ion energetics data were referenced from NIST Chemistry WebBook<sup>88)</sup>

次に、LC移動相に用いる水系溶媒の種類がCNP-d<sub>4</sub>の強度に与える影響を検討した結果、Table 5-3に示すとおり、最も気相酸性度の低い水を用いた場合に最も高いCNP-d<sub>4</sub>強度が得られた。このとき移動相として用いた、水、酢酸及びギ酸の気相酸性度 (kJ/mol) はそれぞれ、1607、1429 及び 1415 であり<sup>88)</sup>、水以外の4種類の水系溶媒では、酢酸やギ酸などの気相酸性度の高い添加物を含んでいることから、反応場における負イオン化阻害が生じたものと考えられる。これらの検討結果から、LC移動相溶媒としてメタノール / 水 (90 : 10) を用いることとした。

Table 5-3 Effect of the different aqueous solvent types in mobile phase on CNP-d<sub>4</sub> intensity

Solvent	Relative Intensity of CNP-d <sub>4</sub> (%)
Methanol / Water (90 : 10)	100
Methanol / 2mM NH <sub>4</sub> Ac (90 : 10)	33
Methanol / 2mM NH <sub>4</sub> FA (90 : 10)	32
Methanol / 0.2% Hac (90 : 10)	2
Methanol / 0.2% FA (90 : 10)	1

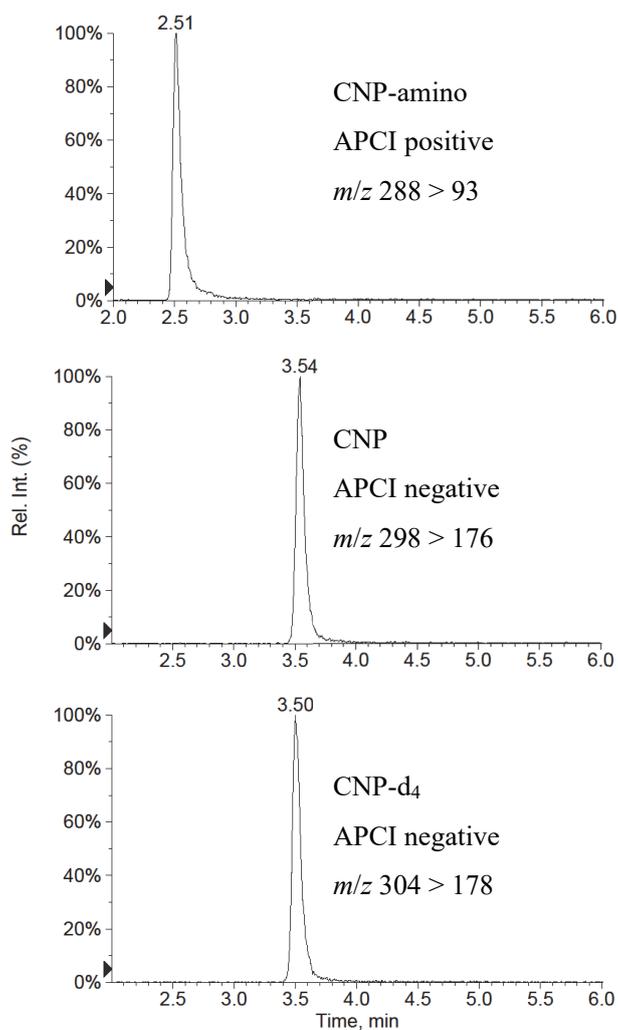


Fig. 5-4 Chromatograms of CNP-amino, CNP and CNP-d<sub>4</sub> (each 1 $\mu$ g/L)

Fig.5-4 に示す通り、この移動相条件で、標準試料を測定して得られたクロマトグラムから、CNPの目標値の1/100として求められる定量下限値を達成するための固相濃縮倍率は、100倍とした。また、構築したLC-MS/MS条件の安定性を確認するため、CNP-d<sub>4</sub> (1 µg/L)の60%アセトニトリル溶液を1時間毎に48時間まで連続測定したところ、得られた強度は概ね一定であり、その相対標準偏差(RSD, %)は2.5%であった。

### (3) 移動相添加物の干渉による影響の検討

上記で用いた水系溶媒の添加物による影響について更に検討するため、用いた水系溶媒により形成されるバックグラウンドイオンを調べた。その結果、Table 5-4 に示す通り、メタノール及び水を用いた場合に  $m/z$  77 が高い強度で観測されたため、これについてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、最も高い強度の組み合わせとして  $m/z$  77 > 60 が得られた。Sekimoto と Takayama<sup>91)</sup>によれば、APCI法ネガティブモードによりO<sub>2</sub>からイオン分子反応で生成する、大気負イオンにおける最終イオンの一つとしてHCO<sub>4</sub><sup>-</sup>が示されており、他の文献<sup>89), 92-94)</sup>でも同様にHCO<sub>4</sub><sup>-</sup> ( $m/z$  77)の生成が報告されていることから、本検討で  $m/z$  77 > 60として観測されたイオンはHCO<sub>4</sub><sup>-</sup> (HCO<sub>4</sub><sup>-</sup> > CO<sub>3</sub><sup>-</sup>)であると推測された。一方で、ギ酸や酢酸を含んだ溶媒で観測されるバックグラウンドイオンについては、気相酸性度の高い添加物によるプロトン移動を介した中性化のため、HCO<sub>4</sub><sup>-</sup>等の大気負イオンの強度が減少したものと考えられた。

Table 5-4 Observed background ions by using different solvent types in mobile phase

Solvent	Ions observed : $m/z$ (relative intensity) [chemical species]
Water	45 (24), 77 (100) $[\text{HCO}_4^-]$ , 78 (8), 89 (6), 112 (14), 122 (9), 124 (6)
Methanol	45 (15), 46 (5), 75 (100), 76 (9), 77 (95) $[\text{HCO}_4^-]$ , 89 (8), 112 (32), 122 (29), 124 (19)
Methanol / Water (90 : 10)	45 (27), 46 (7), 75 (93), 76 (8), 77 (100) $[\text{HCO}_4^-]$ , 89 (9), 112 (30), 122 (25), 124 (17)
Methanol / 2mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ (90 : 10)	45 (52), 46 (6), 59 (24) $[\text{CH}_3\text{COO}^-]$ , 75 (19), 77 (67) $[\text{HCO}_4^-]$ , 91 (7), 92 (93), 112(38), 119(100) $[\text{2}\times\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}^-]$
Methanol / 2mM $\text{NH}_4\text{FA}$ (90 : 10)	45 (100) $[\text{HCOO}^-]$ , 75 (9), 77 (14) $[\text{HCO}_4^-]$ , 78 (8), 91 (94) $[\text{2}\times\text{HCOOH} - \text{H}^-]$ , 92 (8), 112(8)
Methanol / 0.2% $\text{HAc}$ (90 : 10)	45 (17), 59 (16) $[\text{CH}_3\text{COO}^-]$ , 92 (12), 105 (16), 119 (100) $[\text{2}\times\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}^-]$ , 120 (33), 121 (9)
Methanol / 0.2% $\text{FA}$ (90 : 10)	45 (89) $[\text{HCOO}^-]$ , 91 (100) $[\text{2}\times\text{HCOOH} - \text{H}^-]$ , 92 (19), 93(7)

Note : Ions ( $m/z$  10~150) that had intensity <5% of the maximum were not included.

次に、水系溶媒の移動相添加物濃度を変化させたときに得られる、 $\text{HCO}_4^-$  ( $m/z$  77 > 60) の強度と、CNP-d<sub>4</sub>の相対強度を比較した結果、Fig.5-5に示す通り、用いた4種類の添加物の全てで、移動相添加物濃度が高くなるほど、 $\text{HCO}_4^-$ の強度とCNP-d<sub>4</sub>の相対強度の両方が低下した。 $[\text{M}-\text{Cl}+\text{O}]^-$ は、 $\text{O}_2^-$ と対象物質との置換反応により生成すると考えられており、また $\text{HCO}_4^-$ も、 $\text{O}_2^-$ 等の反応イオンを経由したイオン発展により生成する大気負イオンであることから、 $m/z$  77 > 60をモニターすることで、移動相添加物の気相酸性度や正の電子親和力の影響などによる、反応場の負イオン化阻害の程度を推測できる可能性が示唆された。

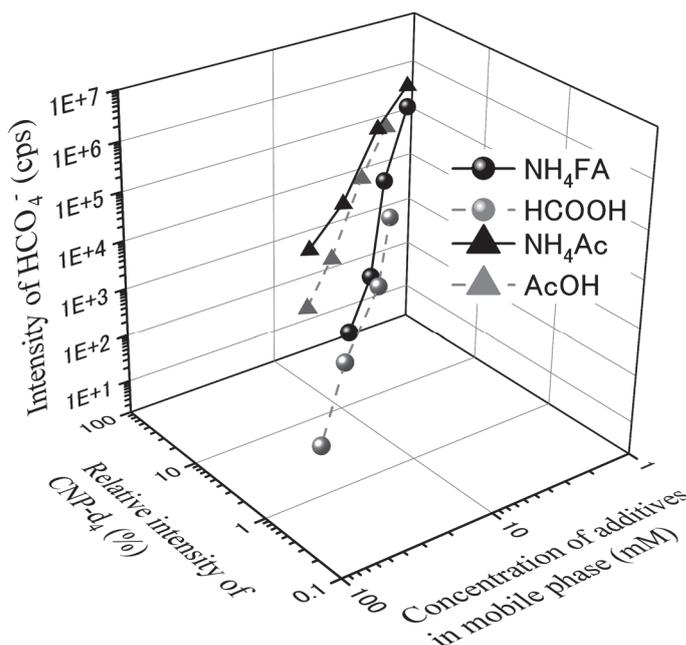


Fig. 5-5 Effect of concentration of mobile phase additives on the intensity of  $\text{HCO}_4^-$  and CNP-d<sub>4</sub>

### 5.3.2 固相抽出時の容器洗い込み方法の検討

CNPは、オクタノール / 水分配係数 4.97<sup>95)</sup>の低極性物質であり、またCNP-アミノ体はその構造内にアミノ基を有することから、いずれも固相抽出時に用いる試料容器への吸着のおそれと考えられる。そこで、固相抽出時における試料容器の洗い込み方法を、精製水又は10~30%アセトニトリル溶液20 mLで2回としたときの水道水添加回収率に与える影響を検討した。

その結果、Fig.5-6に示す通りCNPについては全ての条件でガイドラインの真度の目標(調製濃度の70~130%)を満たし、洗い込みに用いる溶液のアセトニトリル濃度が増すほど、CNP回収率も僅かずつではあるが増加した。一方で、CNP-アミノ体についても、全ての条件でガイドラインの真度の目標を満たしたが、洗い込みに用いる溶液のアセトニトリル濃度を10%より高くすると、僅かずつではあるが、回収率が低下した。Fig.5-3からも、

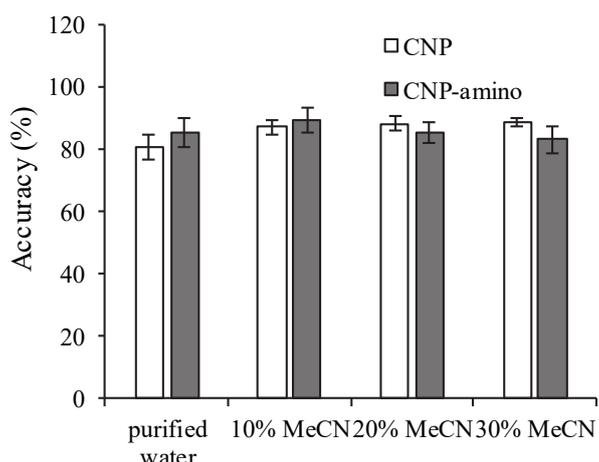


Fig. 5-6 Effect of sampling bottle rinsing solvent on the accuracy  
(Average value ± standard deviation)

CNP-アミノ体はCNPよりもオクタノール / 水分配係数が低いと考えられるため、洗い込んだ溶液を固相に通水した際に、一部が保持されずに通過した可能性が示唆された。これらの結果から本法では、10% アセトニトリル溶液を用いて洗い込みを行うこととした。

### 5.3.3 水道水添加回収試験と妥当性評価

#### (1) 検量線の評価

本法を用いて作成した検量線の妥当性を判断するため、ガイドラインに従い、検量線の評価項目として設定されている真度及び精度について評価を行った結果を **Table 5-5** に示す。このとき作成したCNP及びCNP-アミノ体の検量線の決定係数 ( $R^2$ ) はそれぞれ、0.9995及び0.9998であった。

検量線の真度については、標準試料の繰り返し測定 (3回) による定量値の平均値を、ガイドラインの目標 (調製濃度の80~120%) と比較した結果、すべての濃度点で目標を満た

Table 5-5 Evaluation results of calibration curve

Sample	Concentration of calibration curve (mg/L)	CNP		CNP-amino	
		Accuracy (%)	Precision (RSD, %)	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)
STD 1	0.05	107	2	106	3
STD 2	0.1	104	3	107	2
STD 3	0.2	101	1	99	4
STD 4	0.5	97	3	100	1
STD 5	1	100	2	99	2
STD 6	2	100	2	100	1

した。

検量線の精度については、標準試料の繰り返し測定（3回）による定量値の相対標準偏差（RSD, %）をガイドラインの目標（ $\leq 20\%$ ）と比較した結果、すべての濃度点で目標を満たした。

## （2）添加試料の評価

本法の妥当性を判断するため、検査員1名が、同一の添加試料を1日に5併行、5日間試験した結果をTable 5-6に示す。添加試料の妥当性評価は、ガイドラインに従い、添加試料の評価項目として設定されている真度、併行精度及び室内精度について評価を行った。

添加試料の真度については、添加試料（ $n=25$ ）の定量値の平均値を用いて添加濃度に対する比を求め、ガイドラインの目標（70~130%）と比較した結果、目標値の1/10及び目標値の1/100のいずれにおいても目標を満たした。

添加試料の併行精度及び室内精度については、各日の添加試料の定量値を用いて精度（RSD, %）を求め、ガイドラインの目標（併行精度  $\leq 30\%$ 、室内精度  $\leq 35\%$ ）と比較した結果、目標値の1/10及び目標値の1/100のいずれにおいても、それぞれの目標を満たした。

Table 5-6 Evaluation results of recovery test by this method

Compound	Spiked concentration (mg/L)	Accuracy (%)	Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
CNP	0.01	100	2	4
	0.001	98	3	4
CNP-amino	0.01	90	2	3
	0.001	92	2	3

## 5.4 まとめ

本研究では、APCI法ネガティブモードによるCNPのフェノキシドイオン生成を用いた、固相抽出-LC-APCI-MS/MSによる水道水中のCNP及びCNP-アミノ体の一斉分析法の検討を行った。

その結果、MS/MS測定条件については、APCI法ネガティブモードを用いることでCNP及びCNP-d<sub>4</sub>において[M-CI+O]<sup>-</sup>型のフェノキシドイオン生成を確認するとともに、APCI-MS/MS一斉測定条件を確立した。また、LC移動相条件については、用いる溶媒の種類を比較検討した結果、メタノール及び水の組み合わせが最も適していた。この移動相条件において、高い強度で生成するバックグラウンドイオンとして $m/z$  77 (HCO<sub>4</sub><sup>-</sup>) が得られたが、水

系移動相への添加物濃度を高めると反応場における負イオン化阻害が生じ、 $m/z$  77 > 60 ( $\text{HCO}_4^-$ ) の強度と CNP- $\text{d}_4$  の相対強度の両方が低下した。このことから、 $m/z$  77 > 60 の強度をモニターすることで、移動相添加物等による反応場の負イオン化阻害の程度を推測できる可能性が示唆された。

構築した本法について妥当性評価試験を行ったところ、検量線については、真度及び精度ともに、ガイドラインの目標を満たした。また、目標値の 1/10 及び目標値の 1/100 濃度における水道水添加回収試験を行った結果、真度、併行精度及び室内精度のすべてで、ガイドラインの目標を満たしたことから、本法は、水道水において目標値の 1/100 まで測定できる CNP 検査法として、適用可能であると考えられる。

## 第6章 総括

### 6.1 本研究のまとめ

第1章でも述べたとおり、水道水の安全を確保するため、水質に係わる全ての項目について高い検査精度で濃度測定し、その結果を浄水処理施設の操作運転に反映することによる水道システム全般の統合管理が重要である。水道水質の検査における精度確保を図るため、厚生労働省は2013年にガイドラインを通知し、標準検査法の設定時あるいは新しい標準検査法の導入時にガイドラインに示された評価基準を満足できることを予め確認することを検査機関に求めている。このガイドライン制定以前に示された標準検査法については、ガイドラインに示された評価基準に対応した必要な測定精度を満たせない恐れがある。また、一部の水質項目に係わる標準検査法については、必要な真度、精度又は定量下限を確保できない可能性が高い「参考法」に位置付けられているものもある。そこで本研究では、それらの検査法のうち、検量線の直線性や結果の再現性に関する問題が多く報告されているNIS告示法と、「参考法」であり、かつ農薬類に対して求められる定量下限値（目標値の1/100）を満足できていないCNP通知法の両標準検査法について、水道水質検査におけるより一層の精度確保を目的として、測定手法の最適化に関する検討を行った。

第2章 NISの物性と試験法原理では、界面活性剤の種類や物性について整理するとともに、NISの物性や水環境動態について説明した。また、NIS検査法について既往の研究成果をまとめるとともに、NIS告示法の発色操作部を構成するCo-NCS法とPAR法の原理について概略を説明した。

第3章 錯形成反応の最適化による水道水中NIS告示法の測定精度の改善では、検量線の直線性や結果の再現性に関する問題がこれまで多く報告されていたNIS告示法について、発色操作部を構成するCo-NCS法とPAR法の2つの錯形成反応に対し、それぞれの錯体の形成条件と収率に着目し、錯形成条件の最適化に関する検討を行った。その結果、構築した本法は告示法と比べて錯生成量を5倍以上にも高めることができたため、必要な供試水量を告示法の半分に減少させることが可能になった。提案した最適化条件の妥当性は、NISの検量線、及び溶解性有機物濃度が異なる数種類の水道水と水道原水に対して行った添加回収試験による回収率に基づき評価を行った。更に、提案した最適化条件に対応して得られたNIS錯体の生成量を、既往の研究報告で示されているNIS錯体に関する3種類の推定化学種を用いて求めた値と比較した結果、Co-NCS法において有機相中に抽出されたNIS錯体の化学種は、 $[(\text{NIS})_2\text{-Co}^{2+}] \cdot \text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$ である可能性が示唆された。

第4章 CNP及びCNP-アミノ体の物性と試験法原理では、CNPの除草剤としての使用経緯やその環境動態について整理するとともに、CNP通知法の概要について説明した。ま

た、CNP 検査法として本研究で用いた LC-MS/MS 法について、他の測定法との比較を交えながらその原理と特徴を説明した。

第5章 固相抽出-LC-APCI-MS/MS による水道水中の CNP 及び CNP-アミノ体の測定手法の検討では、目標値の 1/100 まで精度よく測定できる CNP 及びその代謝物である CNP-アミノ体の LC-MS/MS による一斉分析法を確立することを目的として検討を行った。イオン化については、CNP の分子構造内に、ESI 法により高いイオン化効率を得られる官能基を有していないことを考慮し、APCI 法を選定した。検討を通じて、APCI 法ネガティブモードにおいて、 $[M-CI+O]^{-}$  型のフェノキシドイオンの生成を確認するとともに、その生成効率が最大となる移動相条件を確立した。また、CNP-アミノ体については、APCI 法ポジティブモードを用いた CNP との同時測定とした。試料水を固相抽出により 100 倍濃縮することで、目標値の 1/100 まで CNP 及び CNP-アミノ体を同時に測定できることを示した。提案した測定条件に基づき添加回収試験を行った結果、両物質ともに、検量線及び水道水添加回収試験の両方の項目で妥当性評価の基準を満たしていることが明らかになった。

更に、水系移動相への酸添加物の有無と種類を変化させた場合における、APCI 法ネガティブモードで生成するバックグラウンドイオンについて検討したところ、メタノール及び水を用いた場合に  $m/z$  77 ( $HCO_4^{-}$ ) が高い強度で生成することを確認した。また、水系移動相に気相酸性度の高い酸添加物を加え、その濃度を高めると反応場における負イオン化阻害が生じ、 $m/z$  77 > 60 ( $HCO_4^{-}$ ) の強度と CNP-d<sub>4</sub> の相対強度の両方が低下することが明らかになった。このことから、APCI 法ネガティブモードにおいて、 $m/z$  77 > 60 の強度をモニターすることで、水系移動相添加物による反応場の負イオン化阻害の程度を推測できる可能性が示唆された。

以上のように本研究では、水道水中の NIS と CNP の検査法について、それぞれ測定手法の最適化による検討を行った結果、求められる定量下限値を確保し、かつ妥当性評価の基準を満足する新たな検査法を提示することができた。

## 6.2 今後の展望

本研究で提案した NIS 検査法は、Co の逆抽出に 40 分もの時間を要するため、今後は、金属抽出剤の添加等による逆抽出部の時間短縮に取り組み、検査法の迅速性を高めるための検討を行っていきたい。

また、本研究で提案した CNP 検査法については、CNP だけでなく他の農薬類との同時分析が可能となれば、検査法の有用性がより高まるため、今後、CNP を含めた農薬類一斉分析法の開発に取り組んでいきたい。

## 参考文献

### 第1章

- 1) 伊藤禎彦、上月康則、山崎慎一、藤原拓、西村文武、山本裕史、橋本温、樋口隆哉、山中亮一、大谷壮介. よくわかる環境工学. 東京、理工図書株式会社(2015).
- 2) 厚生労働省. 水道法. 昭和三十二年法律第七十七号(1957).
- 3) 厚生労働省. 水質基準に関する省令. 厚生労働省令第 101 号(2003).
- 4) 厚生労働省健康局. 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について. 平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010004 号(2003).
- 5) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課. 水道水質管理計画の策定に当たっての留意事項について. 平成 4 年 12 月 21 日付衛水第 270 号(1992).
- 6) 厚生労働省. 水道水質基準について.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html>(参照 2020.03.28).
- 7) 水質検査の信頼性確保に関する取組検討会. (資料 2-1) 水道法に基づく水質検査制度.  
[https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kentoukai/dl/kensa\\_annai02.pdf](https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kentoukai/dl/kensa_annai02.pdf) 平成 22 年度第 1 回水質検査の信頼性確保に関する取組検討会(2010).
- 8) 厚生労働省水道課水道水質管理室. 水道水質管理の最近の動向について. 水道水質検査精度管理に関する研修会 令和元年度研修会配布資料(2020).
- 9) 水質検査の信頼性確保に関する取組検討会. 水質検査の信頼性確保に関する取組について(2010).
- 10) 厚生労働省. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法. 厚生労働省告示第 261 号(2003).
- 11) 厚生労働省健康局水道課. 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について. 平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010001 号(2003).
- 12) 厚生労働省健康局水道課. 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン. 平成 24 年 9 月 6 日付健水発 0906 第 1 号 (2012).
- 13) 日本水道協会. 上水試験方法 (2011 年版). 東京、日本水道協会(2011).
- 14) 厚生労働省. 水道水質検査法検討会.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kentoukai/suido.html>(参照 2020.03.28).

## 第2章

- 15) 中西準子、林彬勸. アルコールエトキシレート(洗剤). 東京、丸善(2007).
- 16) 経済産業省. 平成30年 経済産業省生産動態統計年報 化学工業統計編(2019).
- 17) 日本水環境学会(水環境と洗剤研究委員会). 非イオン界面活性剤と水環境. 東京、技報堂出版株式会社(2000).
- 18) 環境省. 平成30年度末の汚水処理人口普及状況について.  
<https://www.env.go.jp/press/107120.html>(参照 2019.04.04).
- 19) 日本水道協会. 上水試験方法 解説編. 2001年版. 東京、日本水道協会(2001).
- 20) 田畑彰久、亀井翼、眞柄泰基、安藤正典、相澤貴子. 界面活性剤の発泡特性に関する研究. 水道協会雑誌、71(10)、pp.2-11(2002).
- 21) Favretto, L., Stancher, B., Tunis, F. An Improved Method for the Spectrophotometric Determination of Polyoxyethylene Non-Ionic Surfactants in Waters as Potassium Picrate Active Substances in Presence of Cationic Surfactants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 14(3), pp.201-214 (1983).
- 22) Crabb, N. T., Persinger, H. E. The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41(11), pp.752-755 (1964).
- 23) Wickbold, R. Die Bestimmung nichtionischer Tenside in Gegenwart anionischer Tenside. *Chemie, physikalische Chemie und Anwendungstechnik der grenzfachenaktiven Stoffe. Berichte vom VI. Inter-nationalen kongreß für grenzflächenaktive Stoffe. Zürich, Switzerland.*(1972).
- 24) Dunphy, J. C., Pessler, D. G., Morrall, S. W., Evans, K. A., Robaugh, D. A., Fujimoto, G., Negahban, A. Derivatization LC/MS for the Simultaneous Determination of Fatty Alcohol and Alcohol Ethoxylate Surfactants in Water and Wastewater Samples. *Environmental Science & Technology*, 35(6), pp.1223-1230 (2001).
- 25) Zembrzuska, J., Budnik, I., Lukaszewski, Z. Separation and determination of homogenous fatty alcohol ethoxylates by liquid chromatography with multistage mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 37(13), pp.1694-1702 (2014).
- 26) Zanette, M., Marcomini, A., Marchiori, E., Samperi, R. High-performance liquid chromatographic-fluorescence determination of aliphatic alcohol polyethoxylates and poly(ethylene glycol)s in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 756(1), pp.159-174 (1996).
- 27) Lemr, K. Homologue separation of linear alcohol ethoxylates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 732(2), pp.299-305 (1996).
- 28) 猪飼誉友、中橋千春、本多幸康、川瀬まさ子、三上栄一. 水道水中の非イオン界面活性剤測定法の改良. 水道協会雑誌、79、pp.15-21(2010).
- 29) Allen, F. J. A Study of, and a Modified Method for, Vogel's Reaction for Cobalt. *Proceedings of*

- the Indiana Academy of Science, pp.147-152(1922).
- 30) Vogel, H. W. Ueber die Erkennung des Kobalts neben Eisen und Nickel. Zeitschrift für analytische Chemie, 21(1), pp.563-564 (1882).
  - 31) West, P. W., de Vries, C. G. Nature of Cobalt-Thiocyanate Reaction. Analytical Chemistry, 23(2), pp.334-337 (1951).
  - 32) Drew, M. G. B., Hamid bin Othman, A. Potassium tetrakis(isothiocyanato)cobaltate(II) trihydrate: a redetermination. Acta Crystallographica Section B, 31(2), pp.613-614 (1975).
  - 33) Amirov, R. R., Skvortsova, E. A., Saprykova, Z. A. Complexation of Cobalt(II) with Thiocyanate Ions in Aqueous Solutions of Nonionogenic Surfactants. Russian Journal of Coordination Chemistry, 29(8), pp.554-558 (2003).
  - 34) 鈴木信男、室井俊一郎. チオシアン酸塩によるコバルトの溶媒抽出法の検討. 分析化学、8(5)、pp.287-292(1959).
  - 35) Hoeve, J. A. V. D. Analysis of textile auxiliary products. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 67(8), pp.649-664 (1948).
  - 36) Hoeve, J. A. V. D. Analysis of Textile Auxiliary Products\*. Journal of the Society of Dyers and Colourists, 70(4), pp.145-154 (1954).
  - 37) Greff, R. A., Setzkorn, E. A., Leslie, W. D. A colorimetric method for the determination of parts/million of nonionic surfactants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 42(3), pp.180-185 (1965).
  - 38) APHA. APHA Method 5540: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th ed. Washington, D. C., USA, American Public Health Association, pp.5-39-5-41(1992).
  - 39) JIS K0102 : 2016. 工場排水試験方法. pp.78-82(2016).
  - 40) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課. 「食品中の食品添加物分析法」の改正について. 別添 1. 平成 20 年 4 月 30 日付食安基発第 0430001 号(2008).
  - 41) 柳田祥三. ポリオキシエチレン誘導体の金属カチオン捕捉作用に関する研究. 油化学、28(11)、pp.816-822(1979).
  - 42) 澤田清、菊地洋一. 非環状ポリオキシエチレン化合物の錯生成反応と分析化学への応用. 分析化学、53(11)、pp.1239-1255(2004).
  - 43) Waldhoff, H., Spilker, R. Handbook Of Detergents, Part C: Analysis. 1st ed. Boca Raton, USA, CRC Press, pp.175 (2004).
  - 44) 眞柄泰基. 水道における化学物質の毒性, 挙動及び低減化に関する研究: 平成 10 年度報告書(1999) .
  - 45) Cheng, K. L., Bray, R. H. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol as Possible Analytical Reagent. Analytical Chemistry, 27(5), pp.782-785 (1955).
  - 46) Pollard, F. H., Hanson, P., Geary, W. J. 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol as a possible analytical reagent for the colorimetric estimation of cobalt, lead, and uranium. Analytica Chimica Acta, 20, pp.26-

- 31 (1959).
- 47) Cheng, K. L., Ueno, K., Imamura, T. CRC Handbook of organic analytical reagents. 2nd ed. Boca Raton, USA, CRC Press, pp.219-226 (1992).
- 48) Merck KGaA. "4-(2-Pyridylazo)resorcinol monosodium salt monohydrate metal indicator Reag. Ph Eur". SAFETY DATA SHEET. Darmstadt, Germany, Merck KGaA (2018).
- 49) Iwamoto, T. Acid-Base Property and Metal Chelate Formation of 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 34(5), pp.605-610 (1961).
- 50) Iki, N., Hoshino, H., Yotsuyanagi, T. High-Performance Separation and Determination of Co(III) and Ni(II) Chelates of 4-(2-Pyridylazo)resorcinol at Femtomole Levels by Capillary Electrophoresis. Chemistry letters, 22(4), pp.701-704 (1993).
- 51) 四ツ柳隆夫、星野仁. PAR の新しい利用法. ぶんせき、11、pp.33-41(1976).
- 52) Mochizuki, K., Imamura, T., Ito, T., Fujimoto, M. Divalent and trivalent cobalt complexes of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in aqueous solutions. Chemistry Letters, 5(11), pp.1207-1212 (1976).
- 53) 四条好雄、武内次夫. 4-(2-ピリジルアゾ)レゾルシノールによるコバルトの吸光光度定量. 分析化学、13(6)、pp.536-540(1964).
- 54) Inaba, K. Determination of Trace Levels of Polyoxyethylene-Type Nonionic Surfactants in Environmental Waters. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 31(1), pp.63-73 (1987).
- 55) Yotsuyanagi, T., Yamashita, R., Aomura, K. Highly selective and sensitive spectrophotometric determination of iron(II) and cobalt(III) with 4-(2-pyridylazo)resorcinol(PAR). Analytical Chemistry, 44(6), pp.1091-1093 (1972).
- 56) 山下隆二、四ツ柳隆夫、青村和夫. 4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシノールによる微量鉄およびコバルトの抽出吸光光度定量. 分析化学、20(10)、pp.1282-1288(1971).

### 第3章

- 57) 今井由記子、岩本隆志、酒井康男、渡邊怜子. ポリプロピレン製容器を用いた非イオン界面活性剤の測定. 平成 24 年度全国水道研究発表会 (水道研究発表会) 講演集、pp.580-581(2012).
- 58) 川口寿之. 非イオン界面活性剤試験操作のポイント. 平成 21 年度 全国飲料水検査研究発表会 抄録集、pp.13-19(2009).
- 59) 高玲華. 非イオン界面活性剤検査法における比色操作方法の検討. 平成 25 年度全国会議 (水道研究発表会) 講演集、pp.612-613(2013).
- 60) 佐久間弘毅. 非イオン界面活性剤 振とう方法における発色強度についての検討. 平成 27 年度全国飲料水検査研究発表会 抄録集、pp.53-54(2015).
- 61) 三枝慎一郎、橋渡健児. 非イオン界面活性剤の分析方法の検討. 工業用水、633、pp.63-67(2015).

- 62) 三浦恭之、鈴木裕子、長谷井真人、康智三. テトラチオシアナトコバルト(II)酸アンモニウムを用いる微量非イオン界面活性剤の抽出/吸光光度定量. 分析化学、38、T15-T20(1989).
- 63) 中川晴淳、平山直紀、本浄高治. クラウンエーテルを用いるアルカリ金属イオンのイオン対抽出におけるカウンターイオンとしての置換フェノールの効果. 分析化学、52、pp.839-842(2003).
- 64) Fernando, Q. "Reactions of Chelated Organic Ligands". *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, Vol. 7. Emeléus, H. J., Sharpe, A. G., eds. Cambridge, USA, Academic Press, pp.248-249 (1965).
- 65) 本浄高治、今泉洋、上田一正、澤田清、田口茂、永長幸雄、長谷川淳、山田明文. 基礎分析化学. 第1版. 京都、化学同人、pp.112-113(1998).
- 66) Yoshio, M., Noguchi, H. Crown Ethers for Chemical Analysis: A Review. *Analytical Letters*, 15, pp.1197-1276 (1982).
- 67) 野口英行. クラウンエーテルを用いるイオン対抽出とその分析化学的応用. 博士論文、九州大学、pp.1-89(1991).
- 68) 武田裕行. 18-クラウン-6, ベンゾ-18-クラウン-6 及びジベンゾ-18-クラウン-6 のアルカリ金属ピクリン酸塩に対する抽出能及び抽出選択能の素平衡定数による原因説明. 分析化学、51、pp.515-525(2002).
- 69) Kudo, Y., Katsuta, S., Takeda, Y. Evaluation of the Hydrophilic Properties of Crown Ether-ion-pair Complexes with Alkali Metal Picrates by Their Distribution into Less-polar Diluents. *Analytical Sciences*, 25, pp.563-566 (2009).

#### 第4章

- 70) 三井東圧化学株式会社精密化学品事業部. CNP の毒性試験の概要. 農薬時報別冊、8、pp.28-33(1991).
- 71) 清家伸康、大谷卓、上路雅子、高菅卓三、都築伸幸. 水田土壤中ダイオキシン類の起源と推移. 環境化学、13(1)、pp.117-131(2003).
- 72) 遠山輝彦、玉川重雄. 除草剤 CNP (MO) の残留性. 農薬科学、3(4)、pp.178-184(1976).
- 73) Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6), pp.838-865 (2006).
- 74) 島津製作所分析計測事業部. GC スクールテキスト-キャピラリ編- (U180-0053B).
- 75) 島津製作所分析計測事業部応用技術部. GCMS 講習会 講義テキスト (LAAQ-B-MS001).
- 76) Shimadzu Corporation. *Fundamental guide to liquid chromatography mass spectrometry*.(2018).
- 77) サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社. 液体クロマトグラフィー/質量分析計の基礎. (2014).
- 78) 株式会社エービー・サイエックス. APCI イオンソース (Heated Nebulizer) 操作マニユ

- アル. (2014).
- 79) 株式会社エービー・サイエックス. 初級定量トレーニングコース - 講義資料 -. (2016).

## 第5章

- 80) 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部改正等における留意事項について. 平成30年3月28日付薬生水発0328第1号 (2018) .
- 81) 小林憲弘、土屋裕子、堀池秀樹、増田潤一、五十嵐良明. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析による水道水中の141農薬の一斉分析法の開発. 水環境学会誌、42(1)、pp.13-25(2019).
- 82) 関本奏子. 大気圧化学イオン化の原理. プラズマ・核融合学会誌、95(6)、pp.262-266(2019).
- 83) Dzidic, I., Carroll, D. I., Stillwell, R. N., Horning, E. C. Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry: Formation of phenoxide ions from chlorinated aromatic compounds. *Analytical Chemistry*, 47(8), pp.1308-1312 (1975).
- 84) Horning, E. C., Carroll, D. I., Dzidic, I., Lin, S. N., Stillwell, R. N., Thenot, J. P. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: Studies of negative ion formation for detection and quantification purposes. *Journal of Chromatography A*, 142(11), pp.481-495 (1977).
- 85) Itoh, H., Kawasaki, S., Tadano, J. Application of liquid chromatography—atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry to pesticide analysis. *Journal of Chromatography A*, 754(1), pp.61-76 (1996).
- 86) Fernández, M., Rodríguez, R., Picó, Y., Mañes, J. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*, 912(2), pp.301-310 (2001).
- 87) 中村直紀. 残留農薬分析におけるESI/APCI同時定量の利用. 日本農薬学会誌、41(2)、pp.254-259(2016).
- 88) Linstrom, P. J., Mallard, W. G., Eds., NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. Gaithersburg, USA, National Institute of Standards and Technology, <https://doi.org/10.18434/T4D303>, (retrieved February 7, 2020).
- 89) Kauppila, T. J., Kotiaho, T., Kostianen, R., Bruins, A. P. Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(2), pp.203-211 (2004).
- 90) Kostianen, R., Kauppila, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(4), pp.685-699 (2009).
- 91) Sekimoto, K., Takayama, M. Observations of different core water cluster ions  $Y^-(H_2O)_n$  ( $Y = O_2, HO_x, NO_x, CO_x$ ) and magic number in atmospheric pressure negative corona discharge mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(1), pp.50-60 (2011).

- 92) McAllister, T., Nicholson, A. J. C., Swingler, D. L. Negative ions in the flame ionization detector and the occurrence of  $\text{HCO}_4^-$ . *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 27(1), pp.43-48 (1978).
- 93) Thomson, B. A., Davidson, W. R., Lovett, A. M. Applications of a versatile technique for trace analysis: atmospheric pressure negative chemical ionization. *Environmental Health Perspectives*, 36, pp.77-84 (1980).
- 94) Song, L., Dykstra, A. B., Yao, H., Bartmess, J. E. Ionization Mechanism of Negative Ion-Direct Analysis in Real Time: A Comparative Study with Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(1), pp.42-50 (2009).
- 95) Kawamoto, K., Urano, K. Parameters for predicting fate of organochlorine pesticides in the environment (I) Octanol-water and air-water partition coefficients. *Chemosphere*, 18(9), pp.1987-1996 (1989).

## 研究業績

### 論文（学位関係）

- 1) 岩間紀知、中村弘揮、李富生. 錯形成反応の最適化による非イオン界面活性剤検査法の測定精度の改善. 水道協会雑誌、89(2)、pp.2-12 (2020).
- 2) 岩間紀知、中村弘揮、李富生. 固相抽出-LC-APCI-MS/MS による水道水中のクロロニトロフェン（CNP）及びCNP-アミノ体の測定手法の検討. 水道協会雑誌、(印刷中).

### 論文（学位関係以外）

- 1) 小林憲弘、宮本紫織、佐藤学、木下輝昭、高木総吉、岩間紀知、粕谷智浩、古川浩司、堀池秀樹、齊藤香織、京野完、高原玲華、五十嵐良明. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析による水道水中の140農薬の一斉分析法の妥当性評価. 水環境学会誌、42(6)、pp.247-258 (2019).

### 学会発表（学位関係以外）

- 1) 秋山愛子、佐藤香代、会田祐司、岩間紀知. ESI/APCI ハイブリッドイオン源を用いたハロ酢酸/フェノール類連続測定 of 検討. 第27回環境化学討論会（2018）.

### 表彰（学位関係）

- 1) 公益社団法人日本水道協会より授与（2020年11月）

有効賞

対象論文：錯形成反応の最適化による非イオン界面活性剤検査法の測定精度の改善. 水道協会雑誌、89(2)、pp.2-12 (2020).

受賞者氏名：岩間紀知、中村弘揮、李富生.

### 表彰（学位関係以外）

- 1) 公益社団法人環境科学会より授与（2019年9月）

論文賞

対象論文：水道水中のグルホシネート・グリホサート・AMPAのLC/MS/MS一斉分析法の妥当性評価. 環境科学会誌、29(3)、pp.137-148(2016).

受賞者氏名：小林憲弘、木下輝昭、鈴木俊也、高木総吉、吉田仁、望月映希、岩間紀知、古川浩司、久保田領志、五十嵐良明.

## 謝辞

本研究の遂行、論文の作成に関して、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました岐阜大学流域圏科学研究センター教授 李富生博士に心から感謝の意を表します。また、副指導教官として環境工学に関するご教示を頂きました元岐阜大学工学部社会基盤工学科准教授 山田俊郎博士に感謝致します。

大変お忙しい中、主査としてご指導いただきました岐阜大学流域圏科学研究センター教授 玉川一郎博士に感謝いたします。また、副査としてご指導いただきました岐阜大学工学部化学・生命工学科教授 リムリーワ博士に感謝いたします。本当にありがとうございます。

本研究は、一般財団法人岐阜県公衆衛生検査センター内で行ったものであり、研究の機会を与えていただきました理事長 片桐卓朗様、常務理事 中村弘揮様に深謝致します。また、研究の遂行にあたっては、水道検査課長 窪田吉洋様をはじめ、水道検査係員の各位に多大な配慮を頂きました。心からお礼申し上げます。学術雑誌への論文投稿に際しては、多大な配慮をいただきました理事兼環境部長 山田雅英様、理事兼検査分析部長 杉浦智彦様、検査分析部次長 稲垣智巳様に深く感謝いたします。

非イオン界面活性剤検査法に関する研究においては、東京都健康安全研究センター 鈴木俊也様、ならびに小杉有希様から、非イオン界面活性剤告示法の原理に関するご助言を頂くとともに文献検索にもご助力いただきました。厚くお礼申し上げます。また、埼玉県企業局水質管理センター 寺中 郁夫様からも、非イオン界面活性剤告示法の原理に関する文献検索にご助力いただきました。厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり多大な理解と援助を頂いた家族に感謝いたします。

2020年9月  
岩間 紀知