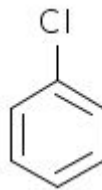


# クロロベンゼン

Chlorobenzene

## 【対象物質の構造】



CAS 番号: 108-90-7

分子式: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl

## 【物理化学的性状】

分子量	沸点(°C)	蒸気圧(kPa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow
112.56	132 <sup>1)</sup>	1.17 (20°C) <sup>1)</sup>	484 (20°C) <sup>1)</sup>	2.84 <sup>1)</sup>

1) Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 2nd Ed. Van Nostrand Reinhold Co.(1983).

## 【毒性、用途】

毒性情報 : ラット(経口、LD<sub>50</sub>) 1427 ~ 3400 mg/kg  
ウサギ(経口、LD<sub>50</sub>) 2250 ~ 2830 mg/kg  
マウス(経口、LD<sub>50</sub>) 1445 mg/kg

用途 : 農・医薬中間体等の合成原料、有機合成反応の溶剤、塗料・インキ

## §1 分析法

### (1) 分析法の概要

生物試料 20 g をメタノールで抽出した後、一部をヘキサン転溶し硫酸処理を行い、GC/HRMS 法で測定する。

### (2) 試薬・器具

#### 【試薬】

クロロベンゼン	: 関東化学株式会社製
クロロベンゼン- $d_5$	: 関東化学株式会社製
ナフタレン- $d_8$	: 和光純薬工業株式会社製
メタノール	: 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮) 和光純薬工業株式会社製
ヘキサン	: 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮) 和光純薬工業株式会社製
硫酸	: 有害金属測定用 和光純薬工業株式会社製
塩化ナトリウム	: 残留農薬試験用 関東化学株式会社製

#### 【器具】

ホモジナイザー、遠心分離器、超音波洗浄器、遠心管、試験管、パストゥールピペット、メスシリンダー、メスフラスコ

### (3) 分析法

#### 【試料採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 18 年 3 月)に従う。

#### 【試料の前処理】

試料 20 g を遠心管に採り、サロゲート物質(クロロベンゼン- $d_5$ )を 100 ng 添加し、均一混合した後、メタノール 20 mL を加え 3 分間ホモジナイズする(注1)。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを回収する。残さにメタノール 15 mL を加え 10 分間超音波抽出を行う。3000 rpm で 10 分間遠心分離し上澄みを合わせ 40 mL に定容したものを、粗抽出液とする。

#### 【試験液の調製】

粗抽出液 8 mL を 25 mL 試験管に分取し、5%塩化ナトリウム水溶液 12 mL、ヘキサン 1 mL を加え 3 分間振とうし、パストゥールピペットでヘキサン層を回収する。この抽出操作を計 2 回行い、回収したヘキサン層を 10 mL 遠心管に合わせる。これに濃硫酸 1 mL を加え、密栓し 1 分間穏やかに反転する(注2)。静置後(注3)、硫酸層をパストゥールピペットで除去し、ヘキサン洗浄水 2 mL を加えヘキサン層を洗浄し、1 時間以上静置する。ヘキサン層が透明になっていることを確認した後、ヘキサン層 1 mL を試験

管にとり、内標準物質としてナフタレン- $d_8$ を 10 ng 添加して試験液とする。

### 【空試験液の調製】

試料を用いずに【試料の前処理】、【試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

### 【標準液の調製】

〔標準原液〕

クロロベンゼン 10 mg を精秤しメタノールを加えて正確に 10 mL とし、1 mg/mL の標準原液を調製する。

〔サロゲート物質原液〕

クロロベンゼン- $d_5$  10 mg を精秤しメタノールを加えて正確に 10 mL とし、1 mg/mL の標準原液を調製する。

〔内標準物質原液〕

ナフタレン- $d_8$  10 mg を精秤しヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、1 mg/mL の標準原液を調製する。

〔検量線作成用サロゲート物質溶液〕

先に作成したサロゲート物質原液より 0.1 mL を分取し、メスフラスコを用いてヘキサンで 100 mL とし、1 ng/ $\mu$ L のサロゲート物質溶液を作成する。

〔試料添加用サロゲート物質溶液〕

先に作成したサロゲート物質原液より 0.1 mL を分取し、メスフラスコを用いてメタノールで 100 mL とし、1 ng/ $\mu$ L のサロゲート物質溶液を作成する。

〔検量線作成用内標準物質溶液〕

先に作成した内標準物質原液より 0.1 mL を分取し、メスフラスコを用いてヘキサンで 100 mL とし、1 ng/ $\mu$ L の内標準物質溶液を作成する。

〔検量線用標準液〕

先に作成した標準原液をヘキサンで順次希釈し、0.1~100 ng/mL の検量線作成用標準液を作成する。各溶液には検量線作成用サロゲート物質溶液および検量線作成用内標準物質溶液を、ともに 10 ng/mL となるよう添加する。



本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

試料前処理液量 : 40 mL  
試料前処理分取量 : 8 mL  
試料量 : 0.020 kg

なお、検出量を算出する際の最終液量は 2 mL となる。

[装置検出下限 (IDL)]

本分析に用いた GC/MS の IDL を以下に示す(注 5)。

物質	IDL (ng/mL)	試料量 (g)	IDL 試料換算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
クロロベンゼン	0.036	20	0.018

[測定方法の検出下限 (MDL)、定量下限 (MQL)]

本測定法における MDL 及び MQL を以下に示す(注 6)。

物質	試料量 (g)	検出下限値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量下限値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
クロロベンゼン	20	0.075	0.18

## 注 解

- (注1) クロロベンゼンは揮発しやすく抽出操作での損失が考えられるため、必要に応じて氷水やドライアイスにより冷却しながら抽出する。
- (注2) 急激な発泡や発熱が起こらないことを確認しながら、最初は穏やかに振り混ぜる。ヘキサン溶液中に水分が多く含まれていると急激に発熱することがあるので、なるべく水分が入らないよう注意する。
- (注3) 試料によっては反転操作後、混合液が懸濁し分離に長時間を要することがあるため、3000 rpm で 20 分間遠心分離を行ってもよい。
- (注4) 質量校正用標準物質としてパーフルオロケロセン(PFK)を用いる場合、PFK由来のフラグメントにより、特に確認用チャンネル( $m/z$  114.0050)のベースラインに影響を及ぼすことがあるため、PFK 導入量はなるべく少なくするよう配慮する。
- (注5) IDL(装置検出下限値)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成18年3月)に従って、表1のとおり算出した。

表1. 装置検出下限(IDL)の算出

物質名	クロロベンゼン
試料量 (g)	20
試料前処理液量 (mL)	40
分取量 (mL)	8
最終液量 (mL)	2
注入液濃度 (pg/ $\mu$ L)	0.1
注入量 ( $\mu$ L)	2
結果1 (pg/ $\mu$ L)	0.114
結果2 (pg/ $\mu$ L)	0.098
結果3 (pg/ $\mu$ L)	0.100
結果4 (pg/ $\mu$ L)	0.103
結果5 (pg/ $\mu$ L)	0.122
結果6 (pg/ $\mu$ L)	0.110
結果7 (pg/ $\mu$ L)	0.097
標準偏差	0.0094
平均値	0.106
IDL (pg/ $\mu$ L)	0.036
換算IDL ( $\mu$ g/kg)	0.018
S/N	7.0
CV (%)	8.9

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

(注6) 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成18年3月)に従って、表2のとおり算出した。

表2 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出

物質名	クロロベンゼン
試料量 (g)	20
標準品添加量 (ng)	0
試料換算濃度 (µg/kg)	0
試料前処理液量 (mL)	40
分取量 (mL)	8
最終液量 (mL)	2
注入濃度 (ng/mL)	0
注入液量 (µL)	2
操作ブランク平均 (µg/kg)	0
無添加平均 (µg/kg)	0.13
結果1 (µg/kg)	0.13
結果2 (µg/kg)	0.12
結果3 (µg/kg)	0.16
結果4 (µg/kg)	0.11
結果5 (µg/kg)	0.14
結果6 (µg/kg)	0.11
結果7 (µg/kg)	0.11
結果8 (µg/kg)	0.14
平均値	0.13
標準偏差	0.021
MDL (µg/kg)	0.075
MQL (µg/kg)	0.18
S/N	6.5
CV (%)	14.4

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

※  $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

① 操作ブランク平均:

試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い、測定した平均値

② 無添加平均:

MDL 算出試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

## §2 解説

### 【分析法】

[フローチャート]

分析法のフローチャートを図1に示す。

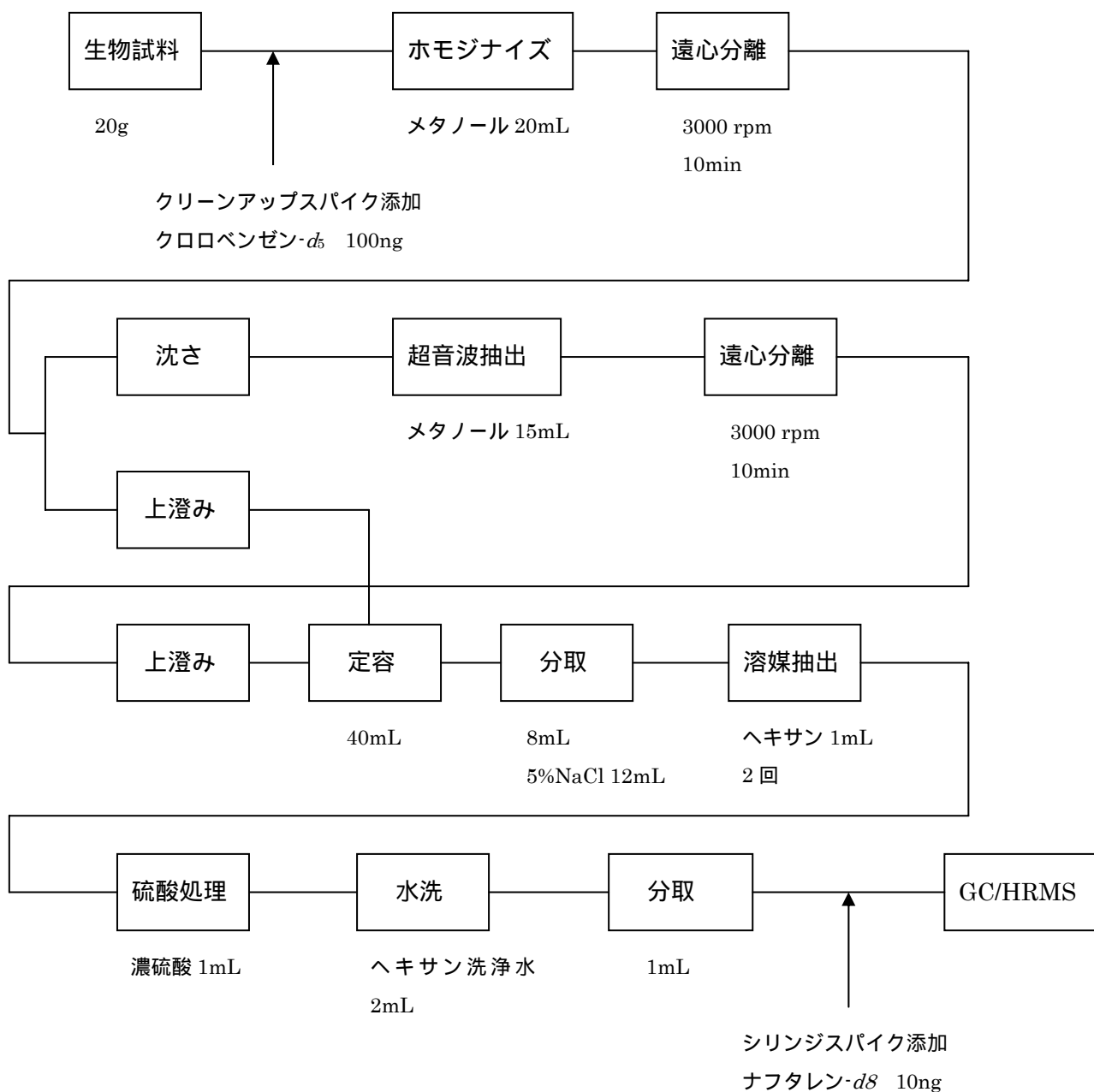


図1 分析法フローチャート

[検量線]

図 2-1、図 2-2 に検量線の例を示す。

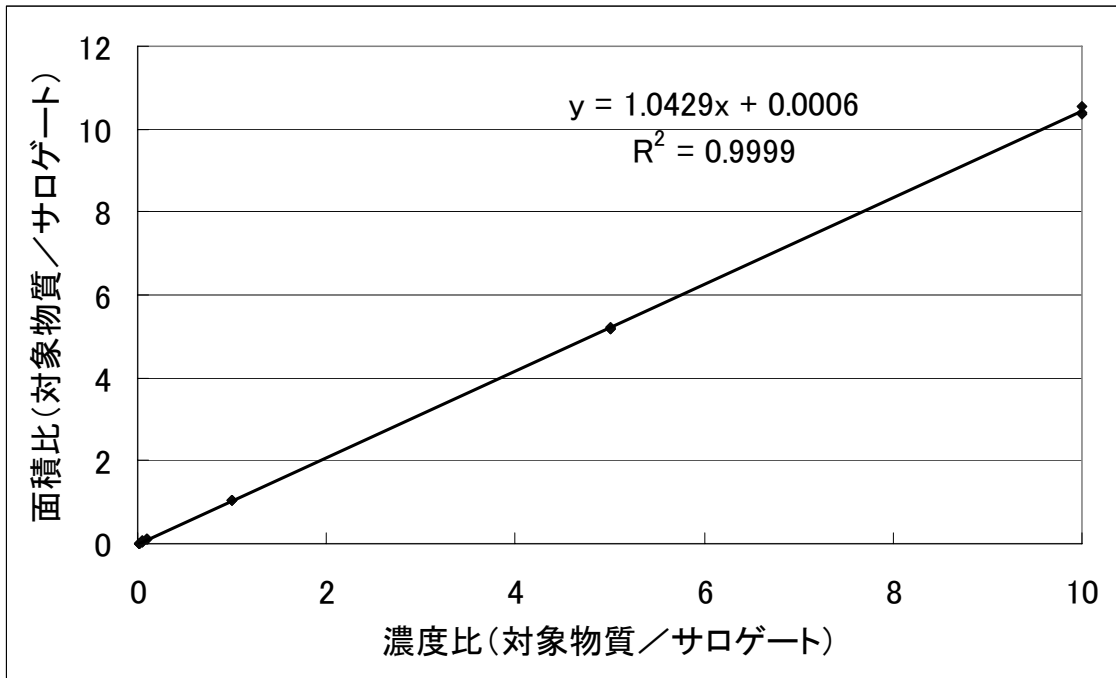


図 2-1 検量線(サロゲート 10 pg/μL、対象物質濃度範囲 0.1~100 pg/μL)

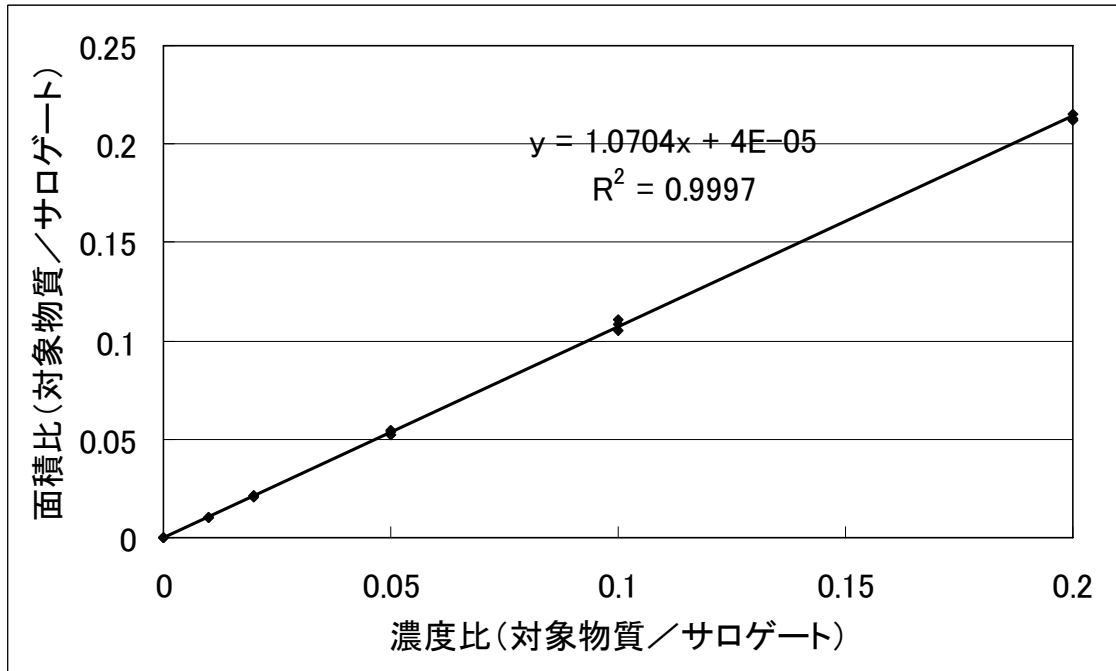


図 2-2 検量線(サロゲート 10 pg/μL、対象物質濃度範囲 0.1~2 pg/μL)

[メタノールからヘキサンへの転溶]

メタノール抽出液からヘキサンへの転溶について検討した。メタノール 8 mL にクロロベンゼン 20 ng を添加し、5%塩化ナトリウム水溶液 12 mL、ヘキサン 1 mL を加え 3 分間振とうしヘキサン層を回収した。再度ヘキサン 1 mL を加え抽出操作を行い、回収したヘキサンを測定した。

クロロベンゼンの絶対回収率は 98%と良好な結果であった。

メタノールからヘキサンへの転溶におけるクロロベンゼンの回収率

物質名	添加量 (ng)	測定回数	絶対回収率 (%)	変動係数 (%)
クロロベンゼン	20	3	98	3.3

[硫酸処理]

硫酸処理によるクロロベンゼンの損失の有無について確認した。クロロベンゼン 20 ng を添加したヘキサン 2 mL に濃硫酸 1 mL を加え、密栓し 1 分間穏やかに反転させ、静置後回収したヘキサンを測定した。

クロロベンゼンの絶対回収率は 100%と良好な結果であった。

硫酸処理におけるクロロベンゼンの回収率

物質名	添加量 (ng)	測定回数	絶対回収率 (%)	変動係数 (%)
クロロベンゼン	20	3	100	5.0

[濃硫酸による分解の有無について]

硫酸処理時の振とう操作によるクロロベンゼンの分解の有無について確認した。クロロベンゼン- $d_5$ を 20 ng 添加したヘキサン 2 mL に濃硫酸 1 mL を加え 3 分間強振し、静置後回収したヘキサンにナフタレン- $d_8$ を添加したものを測定した。

クロロベンゼン- $d_5$ の絶対回収率は 101%と良好な結果であり、振とう操作時における濃硫酸によるクロロベンゼン- $d_5$ の分解は無いものと考えられるが、実試料の測定を行う際には濃硫酸と夾雑物の反応を考慮し穏やかに反応させることとする。

振とう操作時のクロロベンゼン- $d_5$ の回収率

物質名	添加量 (ng)	測定回数	絶対回収率 (%)	変動係数 (%)
クロロベンゼン- $d_5$	20	3	101	3.4

[硫酸処理後の水洗操作による損失について]

硫酸処理後の水洗操作によるクロロベンゼンの損失の有無について確認した。クロロベンゼンを 20 ng 添加したヘキサン 2 mL に濃硫酸 1 mL を加え密栓し 1 分間穏やかに反転させ、静置後ヘキサン層を回収した。ヘキサン層をヘキサン洗浄水 2 mL で洗浄したものを測定した。

クロロベンゼンの絶対回収率は 96%と良好な結果であった。

硫酸処理後水洗操作時のクロロベンゼンの回収率

物質名	添加量 (ng)	測定回数	絶対回収率 (%)	変動係数 (%)
クロロベンゼン	20	3	96	2.5

[マススペクトル]

クロロベンゼンのマススペクトルを図3に示す。

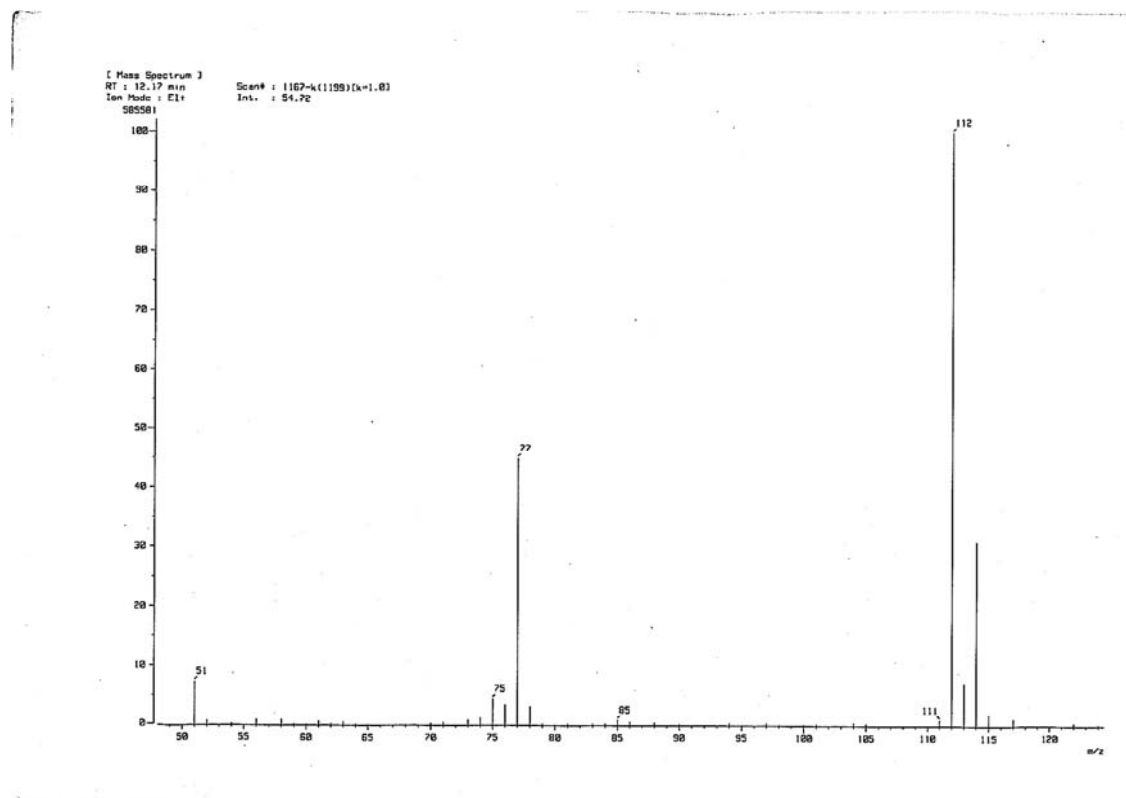


図3 クロロベンゼンのマススペクトル

[代表的なクロマトグラム]

標準液のクロマトグラムを図4に示す。

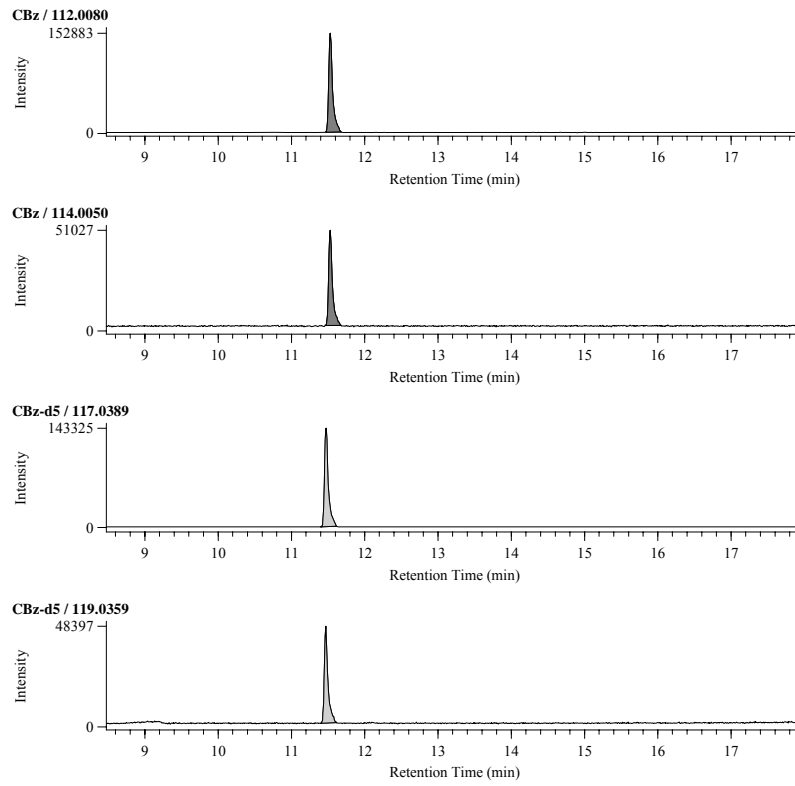


図4 標準液(対象物質:10 pg/μL、サロゲート:10 pg/μL)のクロマトグラム

[IDL 算出時のクロマトグラム]

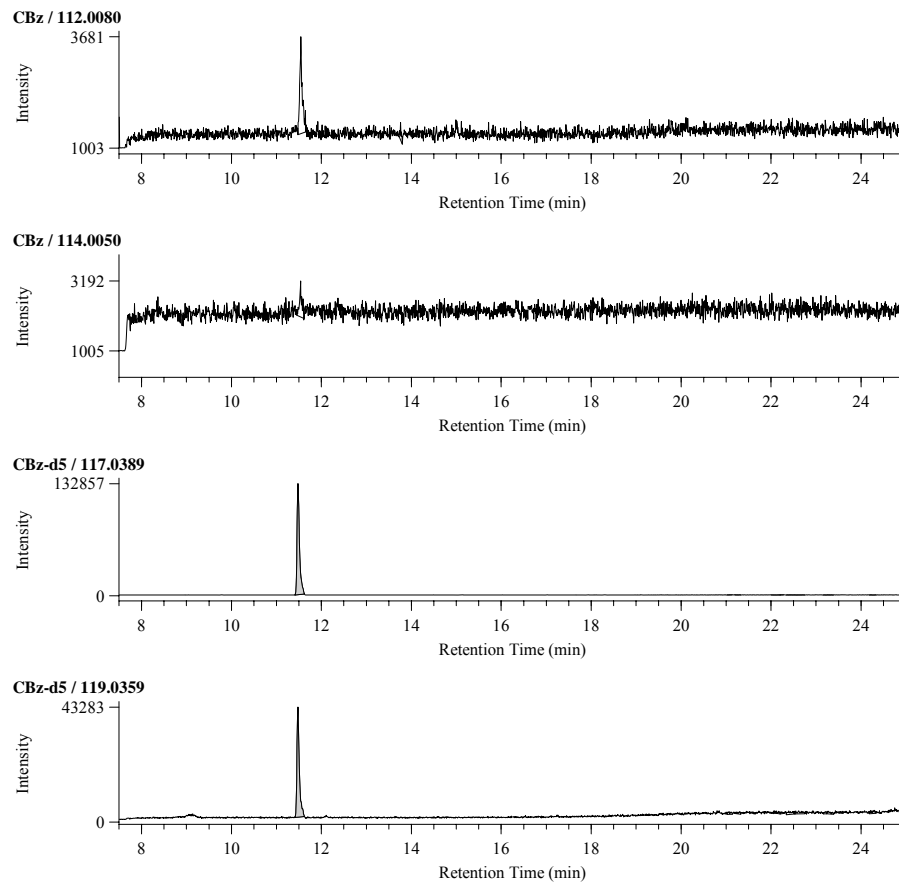


図 5 標準液(対象物質:0.1 pg/μL、サロゲート:10 pg/μL)のクロマトグラム

[添加回収試験結果]

スズキ(大阪湾)への標準物質添加回収試験結果を以下に示す。なお、添加回収試験におけるサロゲートの回収率は平均 74%であった。

添加回収試験結果

試料名	試料量 (g)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (μg/kg)	絶対回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)	変動係数 (%)
スズキ	20	無添加	7	0.13	—	67	—
	20	50	5	2.83	108	74	11.7

[環境試料分析例]

スズキ(平成 19 年度大阪湾において採取、凍結保存した試料)からクロロベンゼンが検出された。

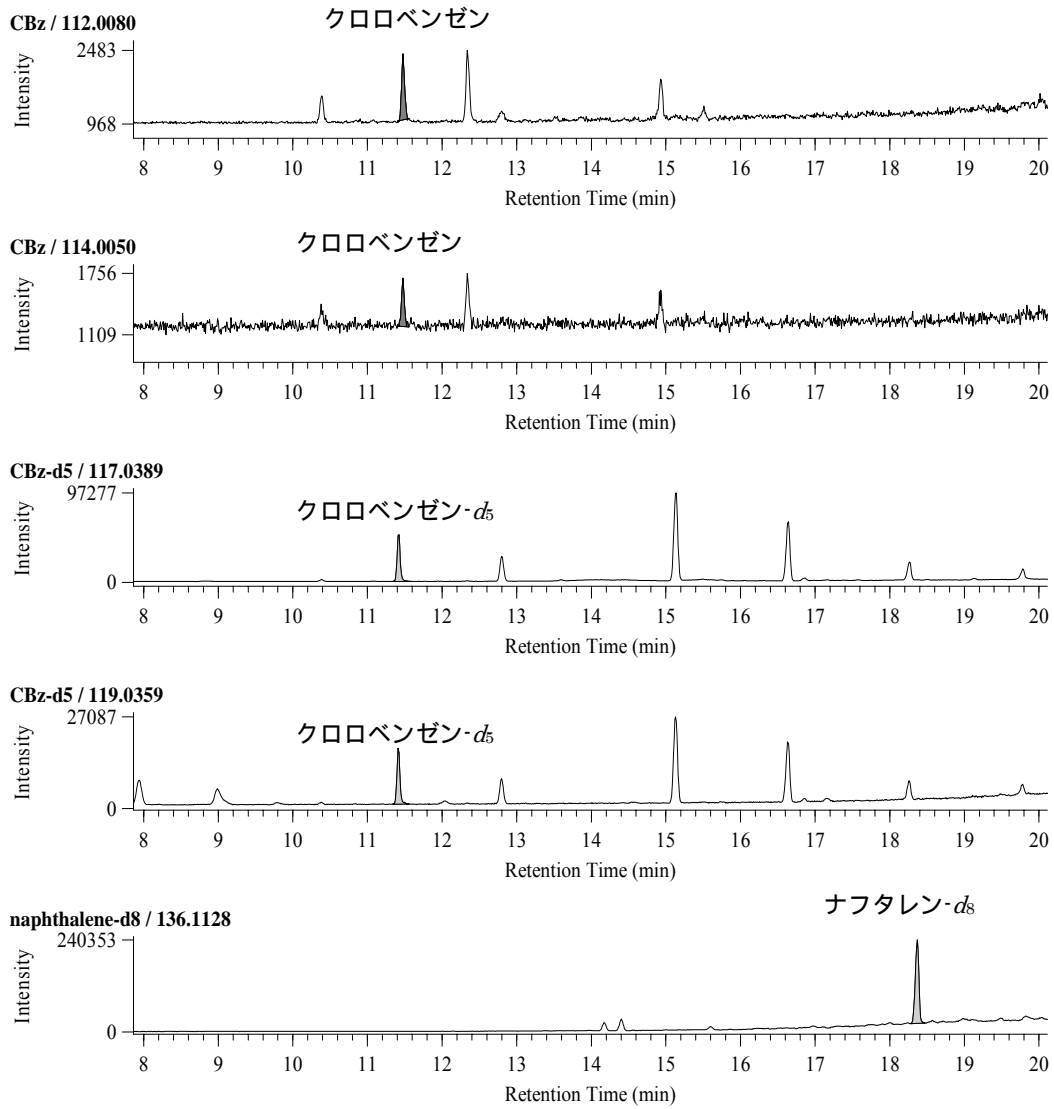


図 6 スズキのクロマトグラム(無添加)

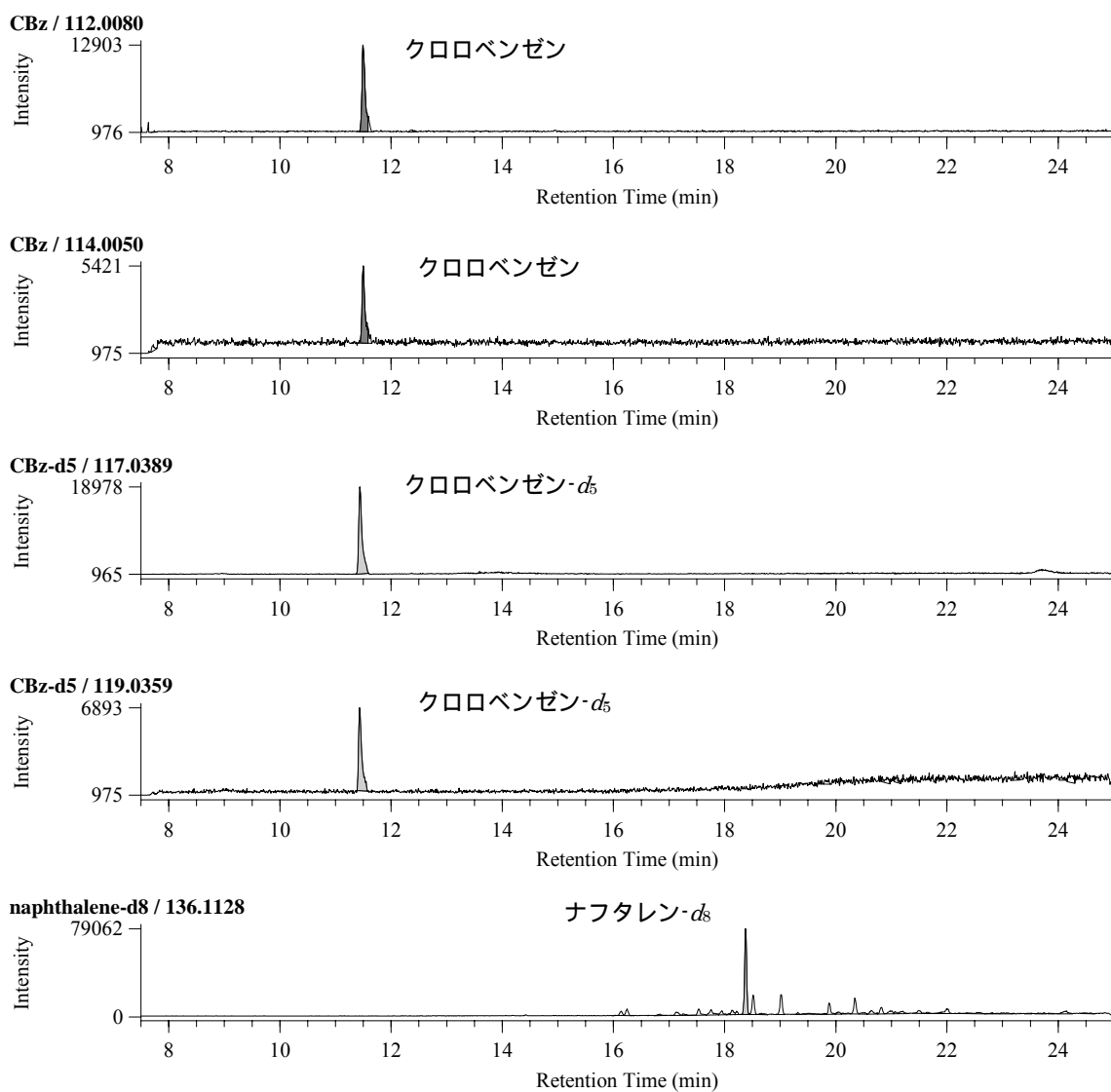


図7 スズキのクロマトグラム(50 ng 添加)

**【評価】**

本法により、生物試料中クロロベンゼンの 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  レベルの定量が可能である。

## 【参考文献】

1. 要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物)  
平成 11 年 12 月環境庁水質保全局水質管理課 .塩化ビニル、メチル t-ブチルエーテル等の揮発性有機化合物の分析法
2. 平成 8 年度化学物質分析法開発調査報告書  
環境庁環境保健部環境安全課 クロロベンゼン、スチレン、1-メチルエチニルベンゼン、2,4-ジクロロトルエン
3. 平成 17 年度化学物質分析法開発調査報告書  
環境省環境保健部環境安全課 トリクロロニトロメタン
4. 化学物質の初期リスク評価書 クロロベンゼン  
2005 年 7 月独立行政法人製品評価技術基盤機構

## 【担当者氏名・連絡先】

担当:大阪府環境農林水産総合研究所  
住所:〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-62  
TEL:06-6972-5865 FAX:06-6972-7695  
担当者:清水武憲  
E-mail:ShimizuTake@mbox.pref.osaka.lg.jp

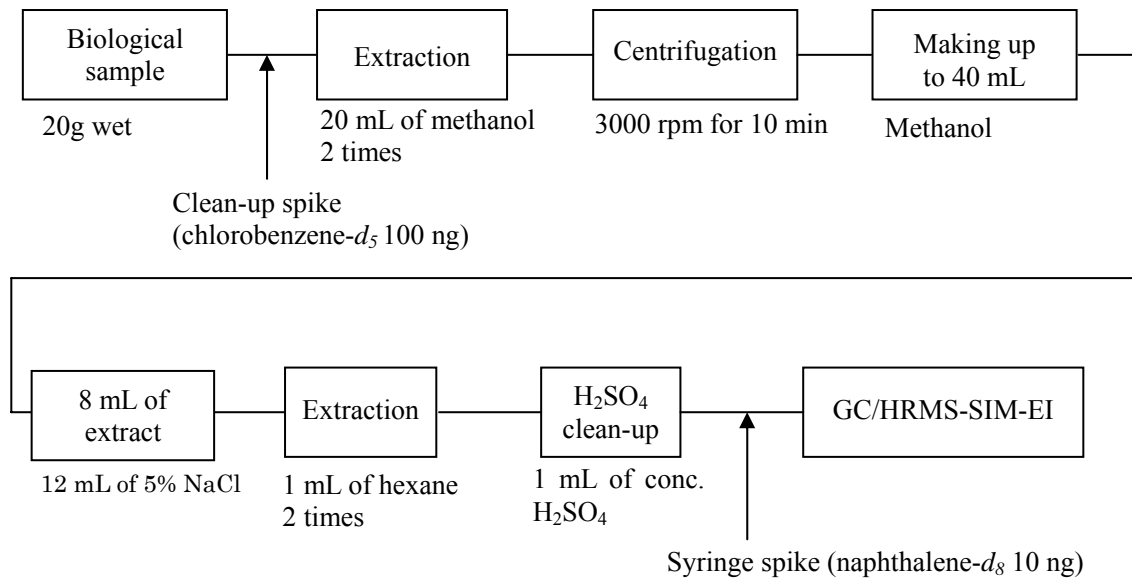
## Chlorobenzene

An analytical method has been developed for the determination of chlorobenzene in biological sample using gas chromatography high-resolution mass spectrometry (GC/HRMS).

A biological sample spiked with the surrogate compound is extracted with methanol 2 times, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. after each extraction. Then, two methanol extracts are combined to 40 mL.

Eight milliliter of extract is extracted with 1 mL of hexane after the addition of 12 mL of 5% sodium chloride solution. It is extracted twice with hexane. The extract is cleaned up with sulfuric acid and analyzed with GC/HRMS.

The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.075  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The average of recoveries ( $n=5$ ) from 50 ng chlorobenzene added sea bass sample was 108%. The relative standard deviation was 11.7%.



物質名	分析法フローチャート	備考
クロロベンゼン	<p><b>【生物】</b></p> <pre> graph TD     A[生物試料 20 g wet ↑ クリーンアップスパイク クロロベンゼン-d5 100 ng] --&gt; B[ホモジナイズ メタノール 20 mL 3 min]     B --&gt; C[遠心分離 3000 rpm 10 min]     C --&gt; D[沈さ]     C --&gt; E[上澄み]     D --&gt; F[超音波抽出 メタノール 15 mL]     F --&gt; G[遠心分離 3000 rpm 10 min]     G --&gt; H[上澄み]     H --&gt; I[定容 40 mL]     I --&gt; J[分取 8 mL 5% NaCl 12 mL]     J --&gt; K[溶媒抽出 ヘキサン 1 mL x 2回]     K --&gt; L[硫酸処理 濃硫酸 1 mL]     L --&gt; M[水洗 ヘキサン洗浄水 2 mL]     M --&gt; N[分取 1 mL]     O[シリンジスパイク ナフタレン-d8 10 ng] --&gt; N     N --&gt; P[GC/HRMS-SIM-EI]   </pre>	<p>分析原理： GC/HRMS-SIM-EI</p> <p>検出下限値： 【生物】(μg/kg) 0.075</p> <p>分析条件： 機器 GC：HP6890 MS：JMS-700D カラム SUPELCO 社製 VOCOL 30m×0.25mm、1.5μm</p>