

2012年度の環境調査において、操作ブランクは分析機関間に差があり、同一分析機関内でも安定していなかったので留意が必要である。
(2013年度精査等検討会コメント)

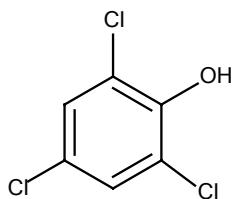
財団法人日本環境衛生センター
[対象媒体：生物]

2,4,6-トリクロロフェノール

2,4,6-trichlorophenol

別名：2,4,6-TCP

【対象物質の構造】



CAS 番号：88-06-2

分子式：C₆H₃Cl₃O

【物理化学的性状】

分子量 (モライトビ ¹⁾ ック質量)	沸点 (°C)	比重	蒸気圧 hPa(76.5°C)	水溶解度 (g / g)	log P _{ow}
197.44 ¹⁾ 195.9249	246 ²⁾	1.4901 ²⁾	1.33 ³⁾	< 0.1 / 100 ²⁾	3.87 ³⁾

【毒性、用途】

[毒性情報]

経口毒性 TD：ラット 374 g/kg (2年)¹⁾、マウス 882 g/kg (2年)¹⁾
TD_{L0}：ラット 441 g/kg (2年)¹⁾、マウス 441 g/kg (2年)¹⁾
LD₅₀：ラット 820 mg/kg¹⁾、トリ 454 mg/kg¹⁾
経皮毒性 LD₅₀：トリ 700 mg/kg¹⁾
腹腔内注射 LD₅₀：ラット 276 mg/kg¹⁾

[用途]

染料中間体、殺菌剤、防腐剤（木材用）⁴⁾

出典：

- 1) 神奈川県化学物質安全情報提供システム(kis-net)
- 2) Budavari, S.,(Ed), The Merck Index Ver.12:2
- 3) International Chemical Safety Cards ICSC1122
- 4) 化学工業日報社

§1 分 析 法

(1) 分析法の概要

生物試料にサロゲート物質を添加し、メタノールを加えてホモジナイズ抽出を行い、メタノール抽出液から脂質をヘキサンに分配して脱脂し、精製水と塩化ナトリウムを加え、塩酸酸性でヘキサンに転溶して抽出する。この抽出液を濃縮し、硫酸ジエチルでエチル誘導体化して、アルカリ分解を行い、水層からエチル誘導体(TCP-EtO)をヘキサンに転溶、脱水する。ヘキサン層を 44% 硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりクリーンアップ後、内標準物質を添加し、GC/MS-SIM で定量する。この分析法は、その他 5 異性体の同時分析に適用が可能である。

(2) 試薬・器具

【試薬】

2,4,6-trichlorophenol	: CIL 製 メタノール溶液、100 µg/mL、>98%
2,4,5-trichlorophenol	: CIL 製 メタノール溶液、100 µg/mL、>98%
2,3,4-trichlorophenol	: SUPELCO 製
2,3,5-trichlorophenol	: SUPELCO 製
2,3,6-trichlorophenol	: SUPELCO 製
3,4,5-trichlorophenol	: SUPELCO 製
2,4,6-trichlorophenol (¹³ C ₆ , 99%)	: CIL 製 メタノール溶液、100 µg/mL、>98%
2,4,5-trichlorophenol (¹³ C ₆ , 99%)	: CIL 製 メタノール溶液、100 µg/mL、>98%
ビフェニル-d ₁₀	: 和光純薬工業製
メタノール、エタノール、ヘキサン、アセトン、トルエン	: 残留農薬試験・PCB 試験用
塩酸	: 特級
水酸化カリウム	: 精密分析用
硫酸ジエチル	: 一級
無水硫酸ナトリウム	: 残留農薬試験・PCB 試験用を 600°C で 6 時間加熱後、放冷する
塩化ナトリウム	: 残留農薬試験・PCB 試験用を 600°C で 6 時間加熱後、放冷する
44% 硫酸シリカゲル	: 和光純薬工業製、ダイオキシン類分析用
精製水	: Milli-Q 水をヘキサン洗浄したもの

【標準液の調製】

〔標準液〕

2,4,6-トリクロロフェノール及び2,4,5-トリクロロフェノールは100 µg/mL 標準液を標準原液とする。その他のトリクロロフェノールは標準物質を正確に25.0 mg 量り取り、メタノール25 mL に溶解し、1000 µg/mL の標準原液とする。標準原液をメタノールで順次希釈し、低濃度領域では0.100~2.00 ng/mL、高濃度領域では0.100~50.0 ng/mL の検量線用標準液とする。

〔サロゲート標準液〕

2,4,6-トリクロロフェノール-¹³C₆ 及び2,4,5-トリクロロフェノール-¹³C₆ の100 µg/mL 標準液をメタノールで希釈し、1000 ng/mL の添加用サロゲート標準液とする。検量線用標準液中のサロゲート物質の濃度は10 ng/mL とする。2,4,6-トリクロロフェノール及び2,4,5-トリクロロフェノールは、それぞれ2,4,6-トリクロロフェノール-¹³C₆ 及び2,4,5-トリクロロフェノール-¹³C₆ をサロゲート物質として検量線を作成する。

〔内標準液〕

内標準物質（ビフェニル-*d*₁₀）を正確に20.0 mg 量り取り、トルエンで20 mL として1000 µg/mL の内標準原液とする。内標準原液をトルエンで順次希釈し、1000 ng/mL の内標準液とする。検量線用標準液中の内標準濃度は25 ng/mL とする。2,3,4-トリクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノール、2,3,6-トリクロロフェノール及び3,4,5-トリクロロフェノールはビフェニル-*d*₁₀ を内標準物質として検量線を作成する。

【器具】

ホモジナイザー	: ポリトロン型
ミキサー	: ボルテックス型
ウォーターバス	: 70°C に加熱できるもの
遠心管	: ガラス共栓付き 10 mL、50 mL
分液ロート	: 300 mL
ナス型フラスコ	: 200 mL
ロート	: 直径 30 mm、75 mm
トラップ球	: ナス型フラスコに装着
ガラスカートリッジ	: 10 mL サイズ
カートリッジ用コック	: 上記カートリッジに取付可能なもの
ガラス製フィルター	: 上記カートリッジに使用できるもの
マイクロシリンジ	: 10 ~ 500 µL
バイアル	: GC 用 2.0 mL バイアル

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 21 年 3 月）の「試料採取及び検体の調製等」に従って採取する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

〔粗抽出液の調製〕

生物試料 5.00 g を遠心管に量り取り、サロゲート標準液(1000 ng/mL) 10.0 μ L を添加し、メタノール 25 mL を加え、ホモジナイズしながら溶媒抽出する。更に、5 分間超音波抽出を行った後、遠心分離(3000 rpm, 10 min)して、上澄みを分液ロート A に分取する。残渣にメタノール 25 mL を加え、再度ホモジナイズしながら溶媒抽出し、遠心分離(3000 rpm, 10 min)して、上澄みを一回目の抽出液を移した分液ロート A に分取して混ぜ合わせ、これを粗抽出液とする。

〔脱脂及びフェノール化合物の液-液分配〕

粗抽出液にメタノールを飽和させたヘキサン（メタノール飽和ヘキサン）10 mL を加え、振とう(10 min)し、静置する。メタノール層とヘキサン層が分離したら、メタノール層を別の分液ロート B に移して、ヘキサン層は廃棄する。このメタノール層に再度、メタノール飽和ヘキサン 5 mL を加え、振とう(10 min)する。メタノール層とヘキサン層が分離したら、メタノール層を分液ロート C に移して、ヘキサン層は廃棄する。分液ロート C に塩化ナトリウム濃度を 10% に調製した精製水 200 mL を加え、0.1 mol/L 塩酸で pH 3~3.5 に調整し、ヘキサン 40 mL を加えて、振とう(10 min)し、静置する。ヘキサン層と水層が分離したら、水層を分液ロート D に移して、これにヘキサン 40 mL を加えて、振とう(10 min)し、静置する。ヘキサン層と水層が分離したら、水層を廃棄して、分液ロート C のヘキサン層と共に、無水硫酸ナトリウムで脱水しながら、ナス型フラスコに受ける。ロータリーエバポレーターで約 8 mL まで減圧濃縮し、10 mL 遠心管 a に移入し、少量のアセトンでフラスコ内壁を洗浄して、これも移し入れる。

〔誘導体化操作〕

窒素気流下で数 mL 濃縮した後、メタノール 0.5 mL を添加し、その後、0.3 mL まで濃縮する。ここに、5%含水 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液（注 1）を 0.3 mL 加え、軽く振り混ぜ、硫酸ジエチル 0.3 mL を添加して、数十秒間よく振り混ぜる。静置後(30 min)、5%含水 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液を遠心管の 3 mL の目盛りまで加え、70°C の湯浴中で 1 時間、アルカリ分解する（注 2）。

〔液-液抽出操作〕

アルカリ分解後、精製水 4 mL 及びヘキサン 1.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間振とう抽出する。これを遠心分離(3000 rpm, 5 min)して、ヘキサン層を分取し、遠心管 b に移す。再度、ヘキサン 1.5 mL で同様の操作を繰り返す、ヘキサン層を分取して、遠心管 b に移す。遠心管 b に精製水 5 mL を入れ、ボルテックスミキサーで 1 分間振とうして、ヘキサン層を水洗する。これを遠心分離(3000 rpm, 5 min)して、ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水しながら遠心管 c に移す。遠心管 b をヘキサン 0.5 mL で 3 回洗浄し、洗浄液は無水硫酸ナトリウムで脱水しながら遠心管 c に移入する。水洗したヘキサン層を窒素気流下で 1 mL に濃縮する。

〔クリーンアップ操作〕

10 mL ガラスカートリッジに 44% 硫酸シリカゲル 0.8 g をヘキサンで湿式充填し、カラムを作成する。カラムをヘキサン 15 mL でコンディショニングし、水洗後の前処理液を入れ、遠心管 c を少量のヘキサンで洗浄した後、ヘキサン 12 mL で溶出する。溶出後、窒素気流下で 1 mL まで濃縮し、シリンジスパイクとして内標準液(1000 ng/mL) 25.0 μ L (25.0 ng) を添加し、試験液とする。

【空試験液の調製】

生物試料の代わりに精製水 4 mL (水分含量 80%相当) を用いて、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔GC/MS 条件〕

使用機種	: GC: Agilent 7890、MS: 5975C
使用カラム	: Agilent HP-1、30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m
カラム温度	: 60°C (1 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 120°C (0 min) \rightarrow 5°C/min \rightarrow 160°C (0 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 300°C (0 min)
注入口温度	: 250°C
試料導入方法	: スプリットレス (パージ開始時間 1 min)
試料注入量	: 1 μ L
キャリアガス	: ヘリウム、1 mL/min (定流量)
インターフェース温度	: 300°C
イオン源温度	: 280°C
イオン化電圧 (イオン化エネルギー)	: 70 eV

検出モード	: SIM
モニターイオン	: 2,4,6-トリクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,3,4-トリクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノール、2,3,6-トリクロロフェノール、3,4,5-トリクロロフェノール (エチル誘導体として測定) $m/z = 198$ (定量用)、 196 (確認用) 2,4,6-トリクロロフェノール- $^{13}C_6$ 、2,4,5-トリクロロフェノール- $^{13}C_6$ (エチル誘導体として測定) $m/z = 204$ (定量用)、 202 (確認用) (注3) ビフェニル- d_{10} $m/z = 164$

〔検量線〕

個々の検量線用標準液 1.0 mL を取り、【試料の前処理及び試験液の調製】の〔誘導体化操作〕から〔液-液抽出操作〕までを行ったのち、これに内標準液 (1000 ng/mL) 25.0 μ L (25.0 ng) を添加する。この溶液 1 μ L を GC/MS に注入して測定する。対象物質の濃度とサロゲート物質の濃度の比と対象物質のエチル誘導体 (TCP-EtO) のピーク面積とサロゲート物質のエチル誘導体のピーク面積の比から検量線を作成する。サロゲート物質が得られない場合においては、対象物質のエチル誘導体 (TCP-EtO) のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 1 μ L を GC/MS に注入し、対象物質とサロゲート物質の各エチル誘導体のピーク面積比からトリクロロフェノール (TCP) の検出量を求める。サロゲート物質が得られない場合においては、試験液 1 μ L を GC/MS に注入し対象物質のエチル誘導体 (TCP-EtO) と内標準物質のピーク面積比からトリクロロフェノール (TCP) の検出量を求める。

〔濃度の算出〕

試料中の濃度 C (ng/g-wet)は次式により算出する。

$$C = C_{ss} \times (A_s / A_{ss} - b) / a \times v / V$$

- C : 試料中の調査対象物質の濃度 (ng/g-wet)
 C_{ss} : サロゲート物質の濃度 (ng/mL)
 A_s : 試験液中の試料のピーク面積

- Ass : 試験液中のサロゲート物質のピーク面積
 a : 検量線の一次回帰式の傾き
 b : 検量線の一次回帰式の y 切片
 v : 最終液量 (mL)
 V : 試料量 (g-wet)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$C_{ss} = 10 \text{ (ng/mL)}$$

$$v = 1.0 \text{ (mL)}$$

$$V = 5.00 \text{ (g-wet)}$$

即ち、

$$C = (As / Ass - b) / a \times 2.0 \text{ (ng/g-wet)}$$

である。

〔回収率の算出〕

検量線作成時に求めた RRF_{is} と試料中の内標準物質のピーク面積とサロゲート物質のピーク面積の比を用いて回収率 R_{is} (%) を次式により算出する。

$$R_{is} (\%) = (Ass / A_{is}) \times (Q_{is} / RRF_{is}) \times (100 / Q_{ss})$$

- Ass : 試験液中のサロゲート物質のピーク面積
 A_{is} : 試験液中の内標準物質のピーク面積
 Q_{is} : 内標準物質の試料への添加量 (ng)
 RRF_{is} : サロゲート物質と内標準物質との相対感度係数の平均値
 Q_{ss} : サロゲート物質の試料への添加量 (ng)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q_{is} = 25 \text{ (ng)}$$

(= 添加した内標準物質の濃度 (1000 ng/mL) × 添加した内標準物質の容量 (0.025 mL))

$$Q_{ss} = 10 \text{ (ng)}$$

(= 添加したサロゲート物質の濃度(1000 ng/mL) × 添加したサロゲート物質の容量 (0.010 mL))

即ち、

$$R_{ss} = (Ass / A_{is}) / RRF_{is} \times 250 (\%)$$

である。

〔装置検出下限値 (IDL)〕

本分析に用いた GC/MS の IDL を表 1 に示す (注 4, 5)。

表 1 IDL の算出結果 (エチル誘導体として測定)

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (g-wet)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/g-wet)
2,4,6-トリクロロフェノール	0.038	5.0	1.0	0.0077
2,4,5-トリクロロフェノール	0.037	5.0	1.0	0.0075
2,3,4-トリクロロフェノール	0.040	5.0	1.0	0.0080
2,3,5-トリクロロフェノール	0.037	5.0	1.0	0.0073
2,3,6-トリクロロフェノール	0.035	5.0	1.0	0.0070
3,4,5-トリクロロフェノール	0.036	5.0	1.0	0.0073

〔測定方法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)〕

本測定方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 5, 6)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果 (エチル誘導体として測定)

物質名	試料量 (g-wet)	最終液量 (mL)	MDL (ng/g-wet)	MQL (ng/g-wet)
2,4,6-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.012	0.030
2,4,5-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.011	0.027
2,3,4-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.0086	0.022
2,3,5-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.0092	0.024
2,3,6-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.0080	0.021
3,4,5-トリクロロフェノール	5.0	1.0	0.0081	0.021

注 解

- (注1) 5%含水 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液は、調製量の 5%の精製水で水酸化カリウムを溶解させた後、エタノールで 1 mol/L の濃度になるように調製する。100%のエタノール溶液で調製すると、誘導体化後に生成する固形物がアルカリ分解時に完全に溶解しない。
- (注2) 遠心管の栓が飛ばないように、クリップ等で留める。

- (注3) サロゲート物質の確認用イオン $m/z = 202$ において、標準物質の濃度が高くなると、マスフラグメントによる妨害を受けることがあることから、サロゲート物質の定量用及び確認用の理論異性体比を±15%以内で定性できる範囲で標準物質の濃度範囲を定めた。
- (注4) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って算出した。算出結果を表 3-1 及び表 3-2 に、測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。
- (注5) ^{13}C ラベル体のサロゲート物質がない異性体については、内標準物質を用いて算出した。
- (注6) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って算出した。算出結果を表 4-1 及び 4-2 に、測定時のクロマトグラムを図 2 に示す。

表 3-1 IDL の算出結果-1 (エチル誘導体として測定)

対象物質名	2,4,6-トリクロロフェノール	2,4,5-トリクロロフェノール	2,3,4-トリクロロフェノール
試料量 (g-wet)	5.00	5.00	5.00
最終液量 (mL)	1.0	1.0	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.100	0.100	0.100
装置注入量(μL)	1.0	1.0	1.0
結果 1 (ng/mL)	0.114	0.116	0.111
結果 2 (ng /mL)	0.109	0.113	0.118
結果 3 (ng /mL)	0.0928	0.102	0.120
結果 4 (ng /mL)	0.0889	0.0943	0.104
結果 5 (ng /mL)	0.0938	0.109	0.111
結果 6 (ng /mL)	0.110	0.119	0.126
結果 7 (ng /mL)	0.0982	0.0965	0.0952
平均値 (ng /mL)	0.1010	0.1070	0.1121
標準偏差 (ng /mL)	0.009850	0.009641	0.01030
IDL (ng /mL)* ¹	0.038	0.037	0.040
IDL 試料換算値 (ng /g-wet)	0.0077	0.0075	0.0080
S/N 比* ²	10	10	9.4
CV (%)	9.8	9.0	9.2

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

*2 : RMS 算出

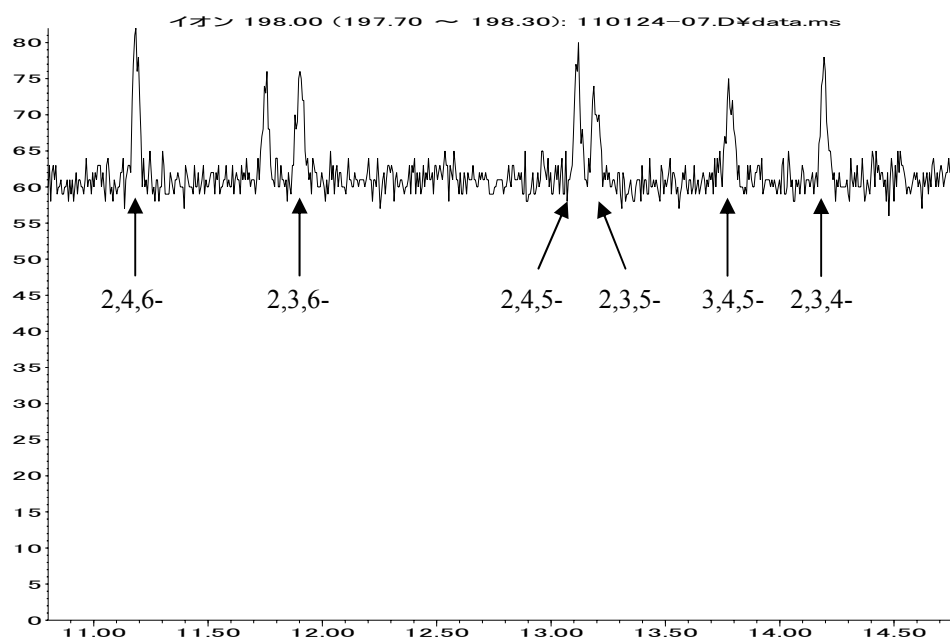
表 3-2 IDL の算出結果-2 (エチル誘導体として測定)

対象物質名	2,3,5-トリクロロフェノール	2,3,6-トリクロロフェノール	3,4,5-トリクロロフェノール
試料量 (g-wet)	5.00	5.00	5.00
最終液量 (mL)	1.0	1.0	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.100	0.100	0.100
装置注入量(μL)	1.0	1.0	1.0
結果 1 (ng/mL)	0.110	0.0954	0.106
結果 2 (ng /mL)	0.114	0.0968	0.112
結果 3 (ng /mL)	0.121	0.0838	0.107
結果 4 (ng /mL)	0.107	0.110	0.106
結果 5 (ng /mL)	0.0960	0.0916	0.103
結果 6 (ng /mL)	0.125	0.107	0.127
結果 7 (ng /mL)	0.114	0.0935	0.122
平均値 (ng /mL)	0.1122	0.09688	0.1118
標準偏差 (ng /mL)	0.009432	0.009013	0.009332
IDL (ng /mL) ^{*1}	0.037	0.035	0.036
IDL 試料換算値 (ng /g-wet)	0.0073	0.0070	0.0073
S/N 比 ^{*2}	7.6	7.9	9.1
CV (%)	8.4	9.3	8.3

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

*2 : RMS による算出

アバダンス



時間-->

図 1 IDL 測定時 (各 0.1 ng/mL) のクロマトグラム (エチル誘導体)

表 4-1 MDL 及び MQL の算出結果-1 (エチル誘導体として測定)

対象物質名	2,4,6- トリクロロフェノール	サゲート 回収率 (%)	2,4,5- トリクロロフェノール	サゲート 回収率 (%)
試料	生物 (スズキ筋肉部)			
試料量 (g-wet)	5.0	-	5.0	-
標準添加量 (ng)	無添加	-	0.100	-
試料換算濃度 (ng/g-wet)	-	-	0.020	-
最終液量 (mL)	1.0	-	1.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	-	-	0.100	-
装置注入量 (μL)	1.0	-	1.0	-
操作ブランク (ng/g-wet) ^{*1}	0.0106	92	ND	98
無添加試料 (ng/g-wet) ^{*2}	0.0194	107	ND	123
結果 1 (ng/g-wet)	0.0211	108	0.0189	123
結果 2 (ng/g-wet)	0.0229	109	0.0232	123
結果 3 (ng/g-wet)	0.0178	108	0.0228	124
結果 4 (ng/g-wet)	0.0170	110	0.0231	123
結果 5 (ng/g-wet)	0.0234	114	0.0241	124
結果 6 (ng/g-wet)	0.0172	111	0.0176	122
結果 7 (ng/g-wet)	0.0164	110	0.0185	123
平均値 (ng/g-wet)	0.01939	110	0.02117	123
標準偏差 (ng/g-wet)	0.002971	1.96	0.002714	0.664
MDL (ng/g-wet) ^{*3}	0.012	-	0.011	-
MQL (ng/g-wet) ^{*4}	0.030	-	0.027	-
S/N 比 ^{*5}	11	-	12	-
CV (%)	15	1.8	13	0.54

*1 : 操作ブランク : 試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値 (n=1)

*2 : 無添加試料 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n=1)

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

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

*5 : RMS による算出

表 4-2 MDL 及び MQL の算出結果-2 (エチル誘導体として測定)

対象物質名	2,3,4-	2,3,5-	2,3,6-	3,4,5-
	トリクロロフェノール	トリクロロフェノール	トリクロロフェノール	トリクロロフェノール
試料	生物 (スズキ筋肉部)			
試料量 (g-wet)	5.0	5.0	5.0	5.0
標準添加量 (ng)	0.100	0.100	0.100	0.100
試料換算濃度 (ng/g-wet)	0.020	0.020	0.020	0.020
最終液量 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.100	0.100	0.100	0.100
装置注入量 (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
操作ブランク (ng/g-wet) ^{*1}	ND	ND	ND	ND
無添加試料(ng/g-wet) ^{*2}	ND	ND	ND	ND
結果 1 (ng/g-wet)	0.0217	0.0242	0.0207	0.0247
結果 2 (ng/g-wet)	0.0208	0.0267	0.0236	0.0281
結果 3 (ng/g-wet)	0.0241	0.0275	0.0195	0.0256
結果 4 (ng/g-wet)	0.0256	0.0244	0.0233	0.0270
結果 5 (ng/g-wet)	0.0253	0.0209	0.0186	0.0252
結果 6 (ng/g-wet)	0.0251	0.0268	0.0214	0.0279
結果 7 (ng/g-wet)	0.0207	0.0270	0.0239	0.0221
平均値 (ng/g-wet)	0.02332	0.02536	0.02157	0.02580
標準偏差 (ng/g-wet)	0.002205	0.002356	0.002070	0.002095
MDL (ng/g-wet) ^{*3}	0.0086	0.0092	0.0080	0.0081
MQL (ng/g-wet) ^{*4}	0.022	0.024	0.021	0.021
S/N 比 ^{*5}	11	11	11	11
CV (%)	9.5	9.3	10	8.1

*1 : 操作ブランク : 試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値 (n=1)

*2 : 無添加試料 : MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度 (n=1)

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

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

*5 : RMS による算出

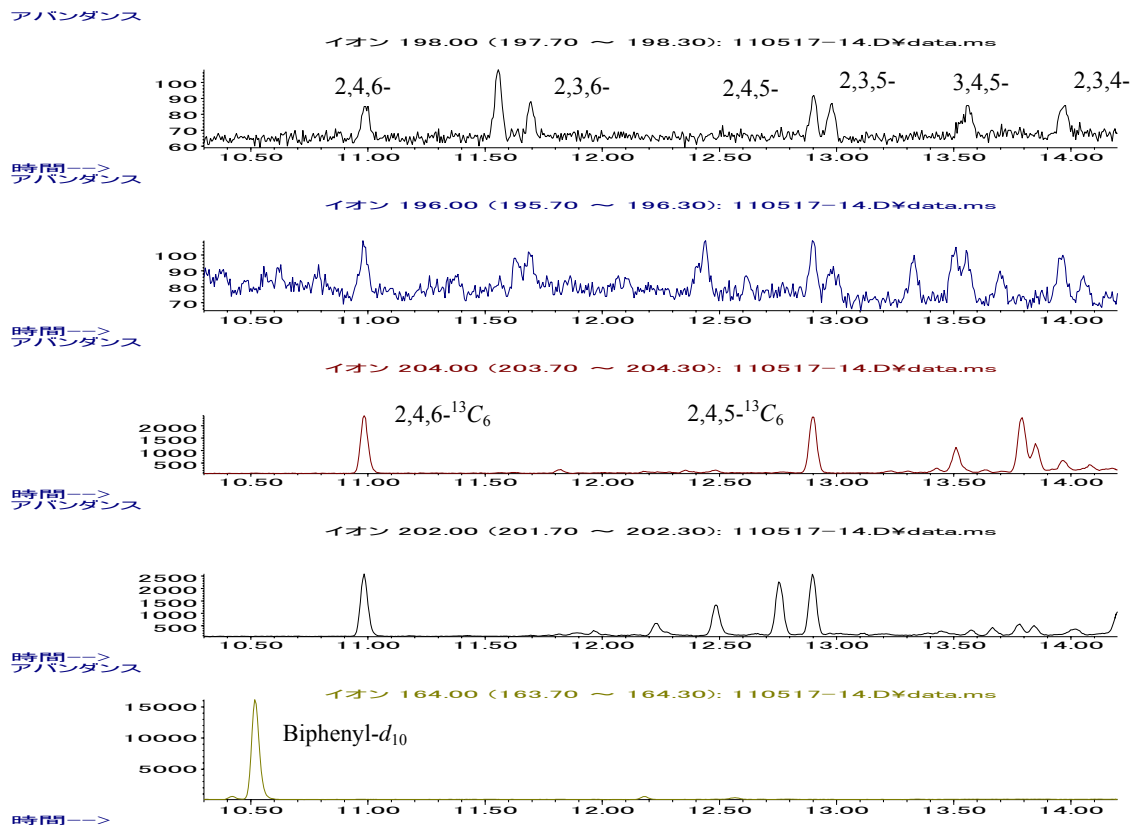


図2 MDL 試験試料 (生物) のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図3に示す。

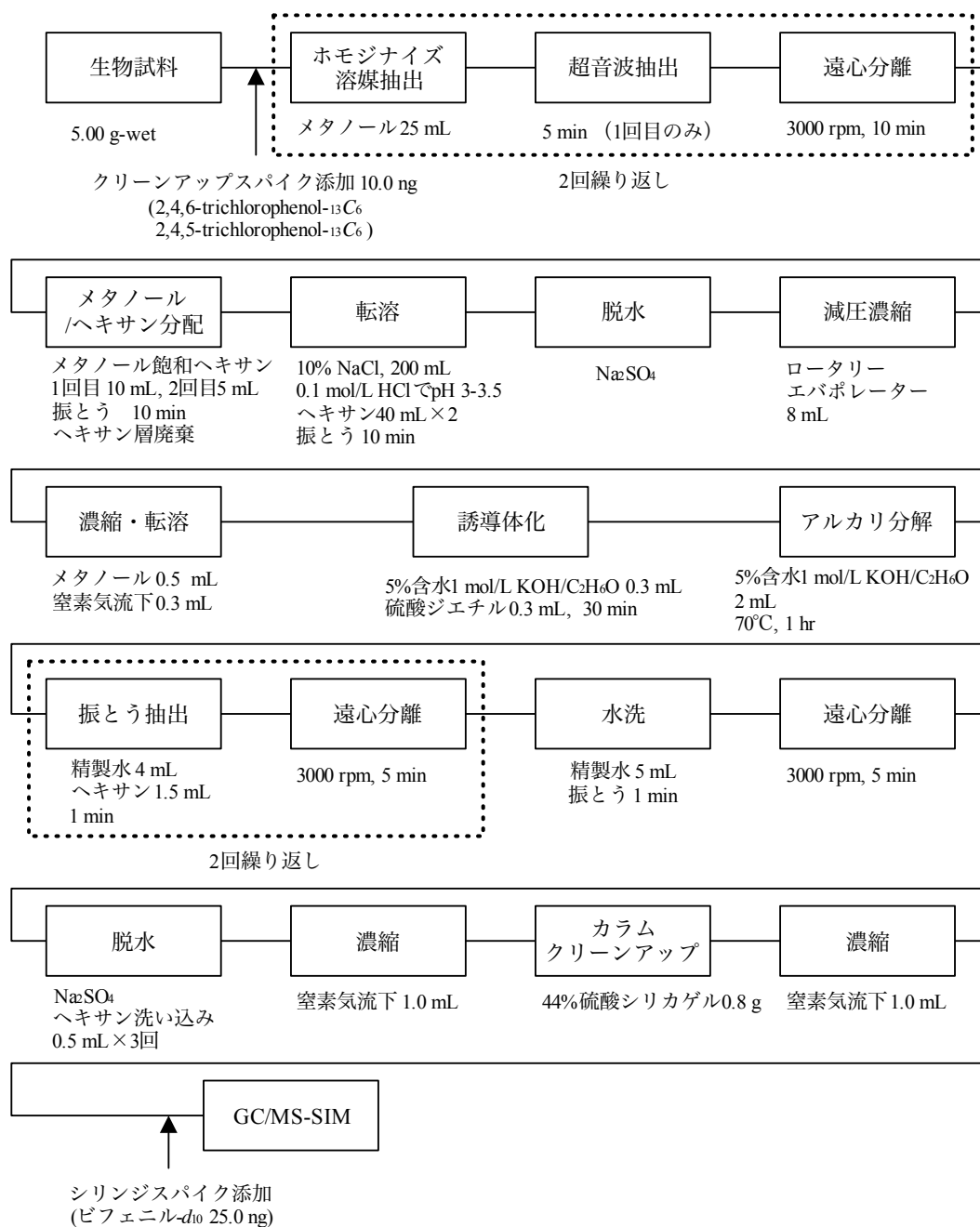
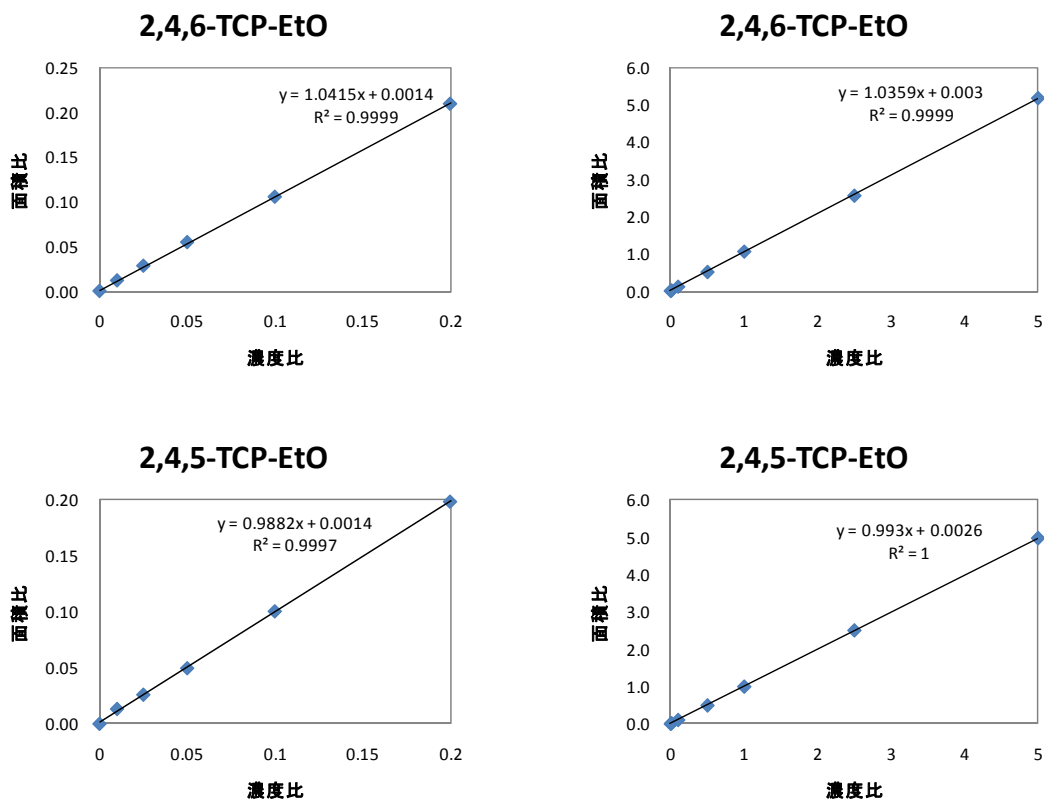


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

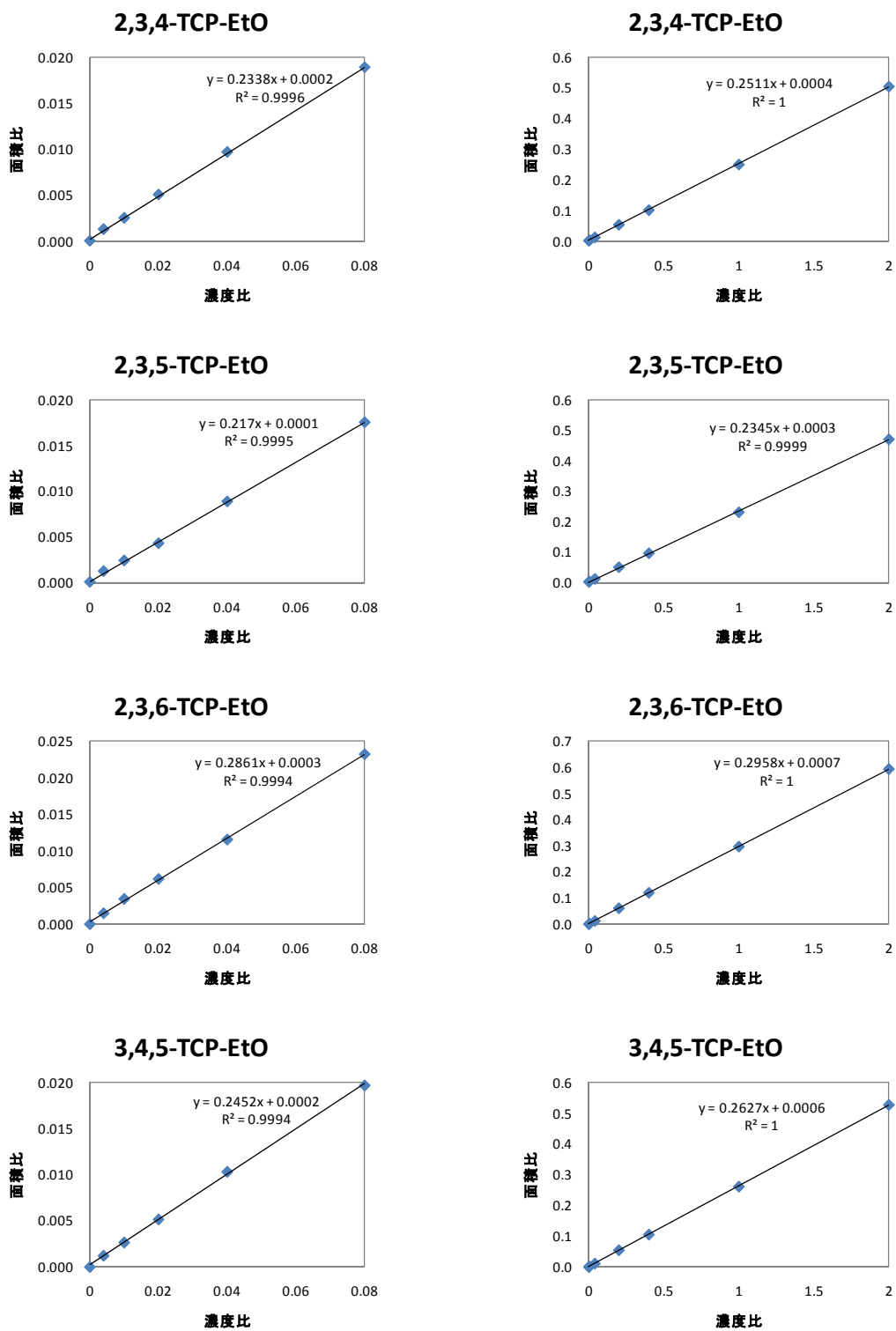
検量線を図 4 及び図 5 に、検量線作成用データを表 5-1～5-6 に、相対感度係数 (RRF) を表 6 に示す。



低濃度領域 (TCP 濃度 0~2.00 ng/mL)

高濃度領域 (TCP 濃度 0~50.0 ng/mL)

図 4 検量線：トリクロロフェノールのエチル誘導体 (TCP-EtO)
 サロゲート物質濃度 (TCP-¹³C₆) 10.0 ng/mL



低濃度領域 (TCP 濃度 0~2.00 ng/mL)

高濃度領域 (TCP 濃度 0~50.0 ng/mL)

図5 検量線：トリクロロフェノールのエチル誘導体 (TCP-EtO)
 内標準物質濃度 25.0 ng/mL

表 5-1 検量線作成用データ (2,4,6-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値			応答比 (A _s / A _{ss})
	対象物質 (A _s)	サロゲート物質 (A _{ss})		
	2,4,6-TCP-EtO m/z = 198	2,4,6-TCP-EtO- ¹³ C ₆ m/z = 204*		
低濃度領域				
0.00	0	3766		0
0.100	40	3363		0.012
0.250	102	3614		0.028
0.500	196	3585		0.055
1.00	378	3586		0.11
2.00	770	3676		0.21
高濃度領域				
0.00	0	3315		0
0.10	52	3442		0.015
1.00	364	3188		0.11
5.00	1804	3535		0.51
10.0	3661	3454		1.1
25.0	9267	3612		2.6
50.0	20895	4024		5.2

*: サロゲート物質濃度 : 10 ng/mL(C_{ss})

表 5-2 検量線作成用データ (2,4,5-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値			応答比 (A _s / A _{ss})
	対象物質 (A _s)	サロゲート物質 (A _{ss})		
	2,4,5-TCP-EtO m/z = 198	2,4,5-TCP-EtO- ¹³ C ₆ m/z = 204*		
低濃度領域				
0.00	0	3329		0
0.100	38	2857		0.013
0.250	80	3071		0.026
0.500	153	3074		0.050
1.00	306	3038		0.10
2.00	628	3157		0.20
高濃度領域				
0.00	0	2985		0
0.100	47	2929		0.016
1.00	294	2857		0.10
5.00	1487	3023		0.49
10.0	3091	3112		0.99
25.0	7733	3096		2.5
50.0	17428	3512		5.0

*: サロゲート物質濃度 : 10 ng/mL (C_{ss})

表 5-3 検量線作成用データ (2,3,4-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値			応答比 (A _s / A _{is})
	対象物質 (A _s)	内標準物質 (A _{is})		
	2,3,4-TCP-EtO <i>m/z</i> = 198	Biphenyl- <i>d</i> ₁₀ <i>m/z</i> = 164*		
低濃度領域				
0.00	0	29202		0
0.100	33	26137		0.0013
0.250	73	29348		0.0025
0.500	148	29486		0.0050
1.00	272	28222		0.010
2.00	547	29037		0.019
高濃度領域				
0.00	0	25978		0
0.100	46	26395		0.0017
1.00	262	24208		0.011
5.00	1334	25517		0.052
10.0	2724	27208		0.10
25.0	6881	27611		0.25
50.0	15380	30529		0.50

*: 内標準物質濃度：25 ng/mL (C_{is})

表 5-4 検量線作成用データ (2,3,5-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値			応答比 (A _s / A _{is})
	対象物質 (A _s)	内標準物質 (A _{is})		
	2,3,5-TCP-EtO <i>m/z</i> = 198	Biphenyl- <i>d</i> ₁₀ <i>m/z</i> = 164*		
低濃度領域				
0.00	0	29202		0
0.100	31	26137		0.0012
0.250	69	29348		0.0024
0.500	125	29486		0.0042
1.00	249	28222		0.0088
2.00	508	29037		0.017
高濃度領域				
0.00	0	25978		0
0.100	43	26395		0.0016
1.00	242	24208		0.010
5.00	1242	25517		0.049
10.0	2579	27208		0.095
25.0	6362	27611		0.23
50.0	14385	30529		0.47

*: 内標準物質濃度：25 ng/mL (C_{is})

表 5-5 検量線作成用データ (2,3,6-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値		
	対象物質 (A _s)	内標準物質 (A _{is})	応答比 (A _s / A _{is})
	2,3,6-TCP-EtO <i>m/z</i> = 198	Biphenyl- <i>d</i> ₁₀ <i>m/z</i> = 164*	
低濃度領域			
0.00	0	29202	0
0.100	39	26137	0.0015
0.250	101	29348	0.0034
0.500	182	29486	0.0062
1.00	326	28222	0.012
2.00	674	29037	0.023
高濃度領域			
0.00	0	25978	0
0.10	49	26395	0.0019
1.00	292	24208	0.012
5.00	1556	25517	0.061
10.0	3258	27208	0.12
25.0	8174	27611	0.30
50.0	18087	30529	0.59

*: 内標準物質濃度 : 25 ng/mL (C_{is})

表 5-6 検量線作成用データ (3,4,5-TCP-EtO)

標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値		
	対象物質 (A _s)	内標準物質 (A _{is})	応答比 (A _s / A _{is})
	3,4,5-TCP-EtO <i>m/z</i> = 198	Biphenyl- <i>d</i> ₁₀ <i>m/z</i> = 164*	
低濃度領域			
0.00	0	29202	0
0.100	32	26137	0.0012
0.250	78	29348	0.0027
0.500	152	29486	0.0052
1.00	291	28222	0.010
2.00	571	29037	0.020
高濃度領域			
0.00	0	25978	0
0.100	49	26395	0.0019
1.00	274	24208	0.011
5.00	1391	25517	0.055
10.0	2867	27208	0.11
25.0	7213	27611	0.26
50.0	16083	30529	0.53

*: 内標準物質濃度 : 25 ng/mL (C_{is})

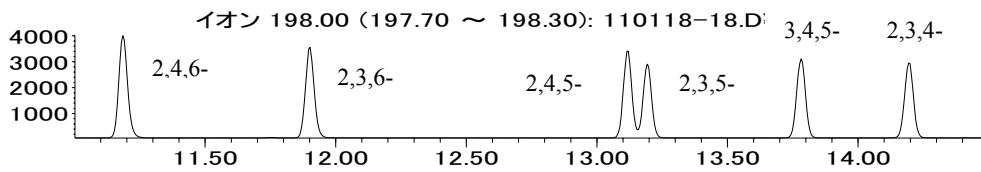
表6 サロゲート物質とシリンジスパイク内標準の RRF

物質名	RRF _{is} (平均値)	標準偏差	CV%
2,4,6-TCP-EtO- ¹³ C ₆	0.315	0.00751	2.4
2,4,5-TCP-EtO- ¹³ C ₆	0.270	0.00892	3.3

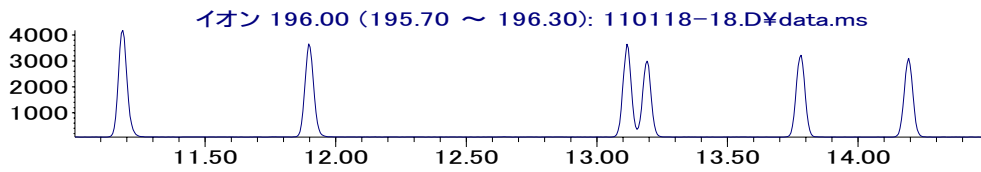
〔各異性体のクロマトグラム〕

図6に各異性体のクロマトグラムを示す。

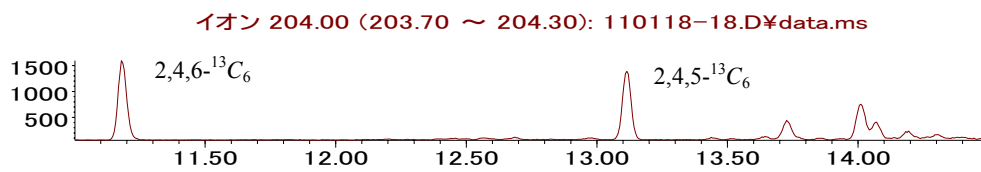
アバundance



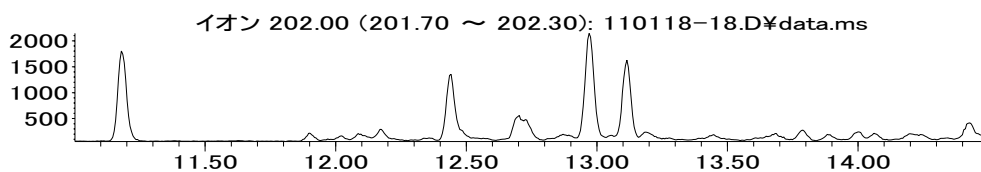
時間-->
アバundance



時間-->
アバundance



時間-->
アバundance



時間-->

図6 トリクロロフェノールのエチル誘導体のクロマトグラム

〔マススペクトル〕

標準液のマススペクトルを図7-1~7-6に、サロゲート物質のマススペクトルを図8-1~8-2に、内標準物質のマススペクトルを図9に示す。

アバundance

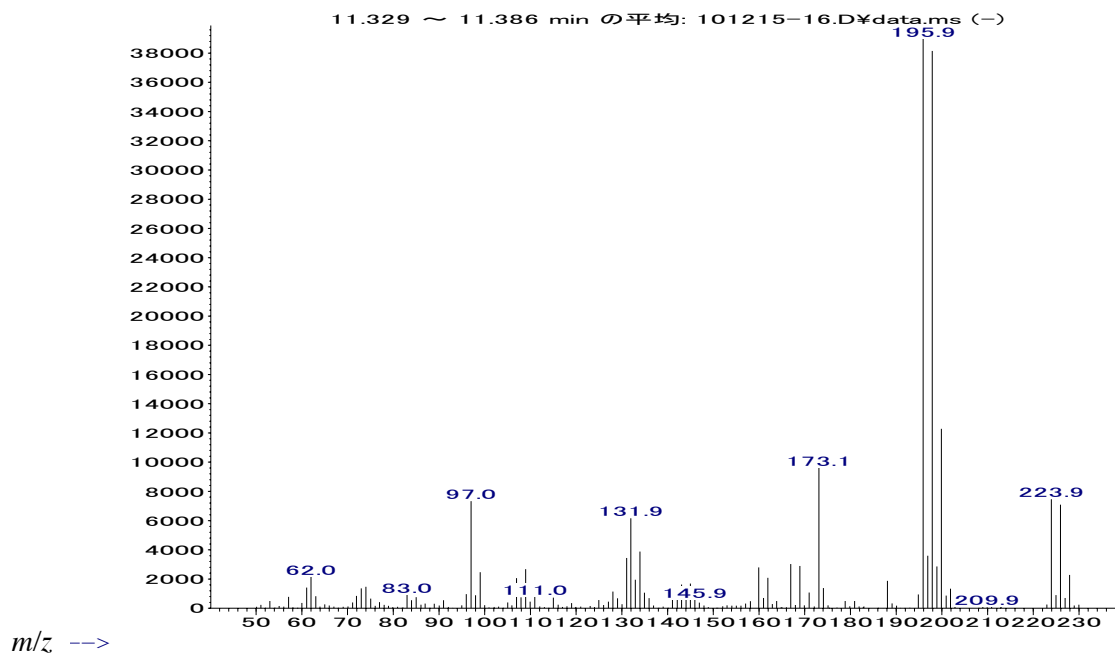


図 7-1 2,4,6-TCP エチル誘導体 (2,4,6-TCP-EtO) のマススペクトル

アバundance

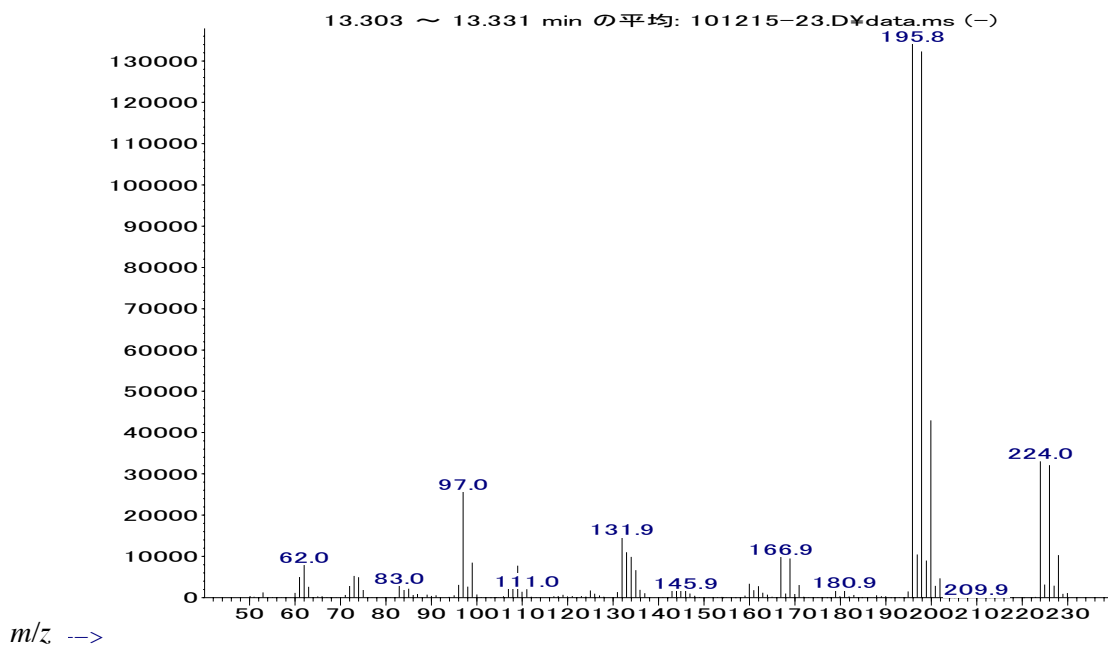


図 7-2 2,4,5-TCP エチル誘導体 (2,4,5-TCP-EtO) のマススペクトル

アバundance

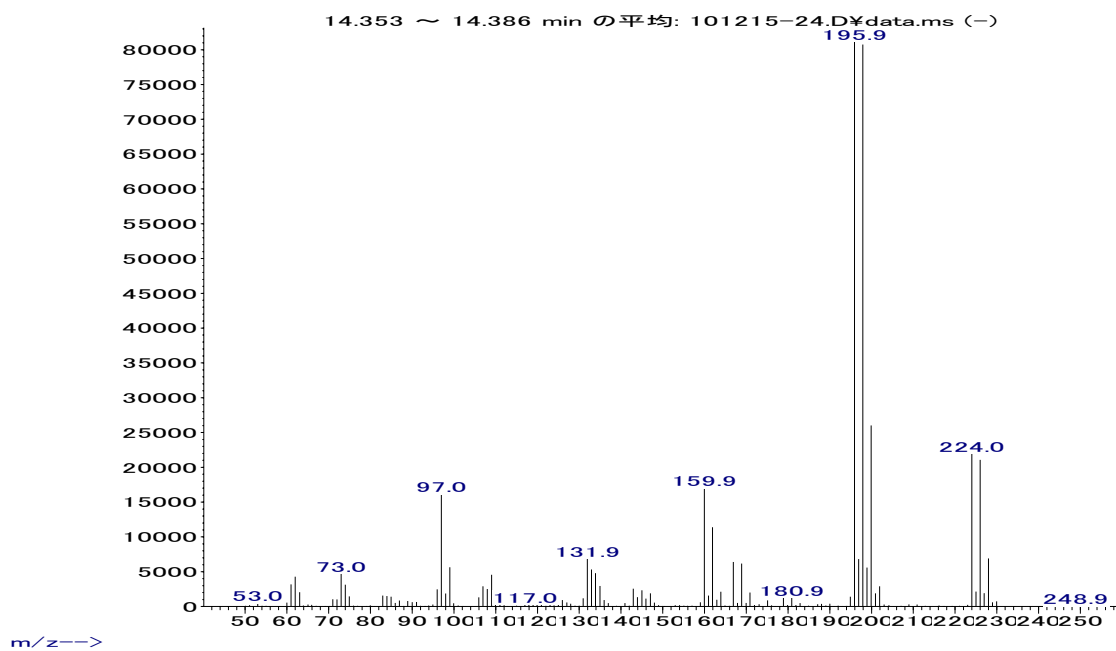


図 7-3 2,3,4-TCP エチル誘導体 (2,3,4-TCP-EtO) のマススペクトル

アバundance

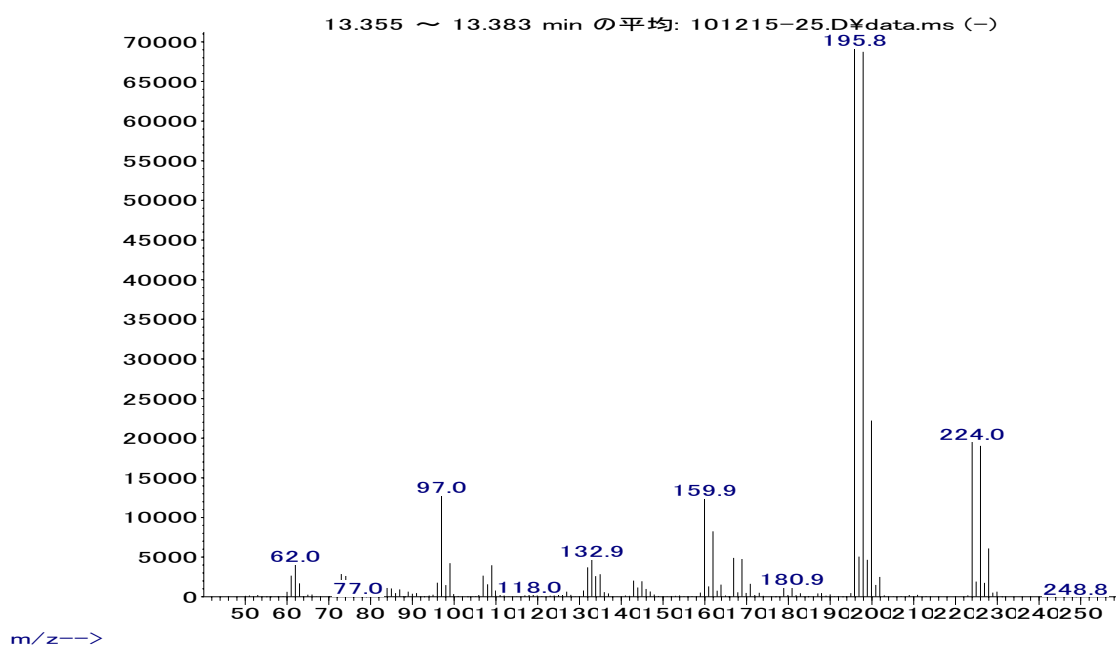


図 7-4 2,3,5-TCP エチル誘導体 (2,3,5-TCP-EtO) のマススペクトル

アバダンス

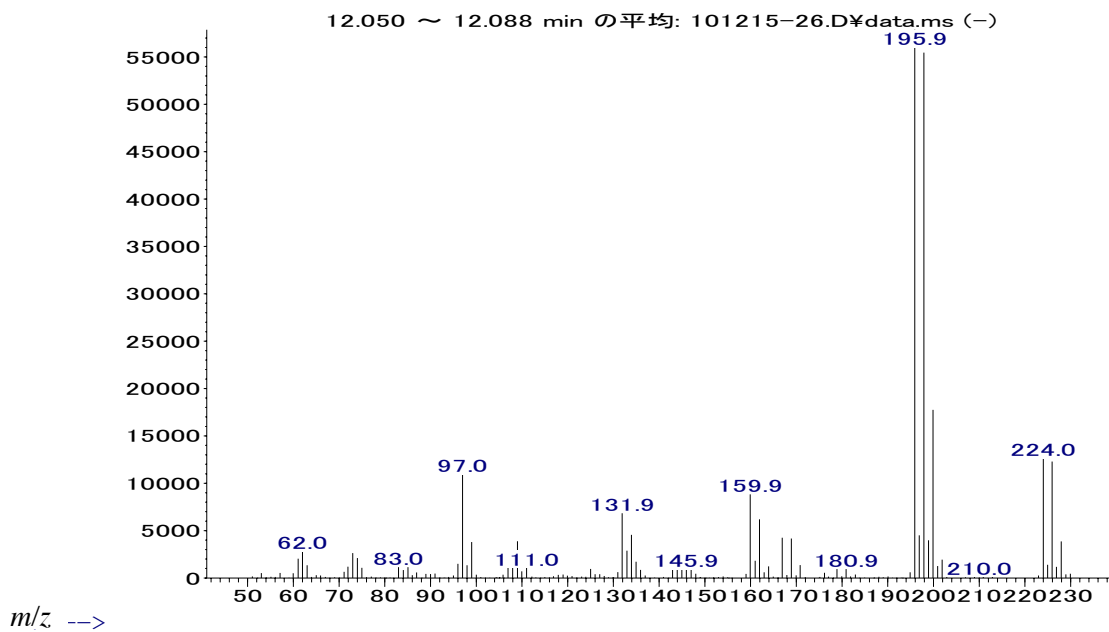


図 7-5 2,3,6-TCP エチル誘導体 (2,3,6-TCP-EtO) のマススペクトル

アバダンス

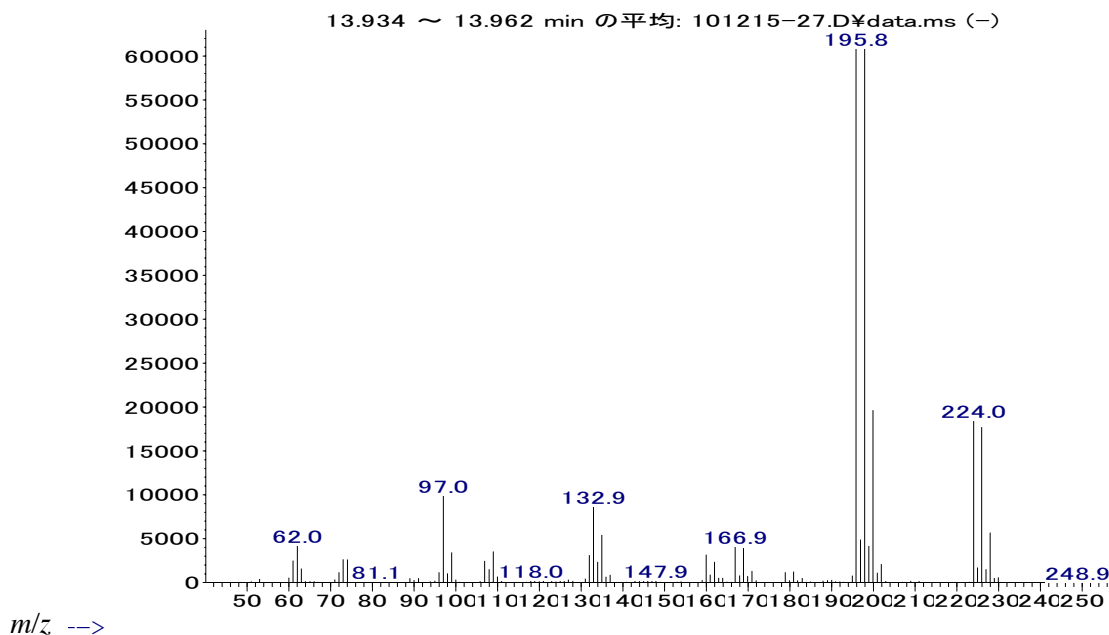


図 7-6 3,4,5-TCP エチル誘導体 (3,4,5-TCP-EtO) のマススペクトル

アバダンス

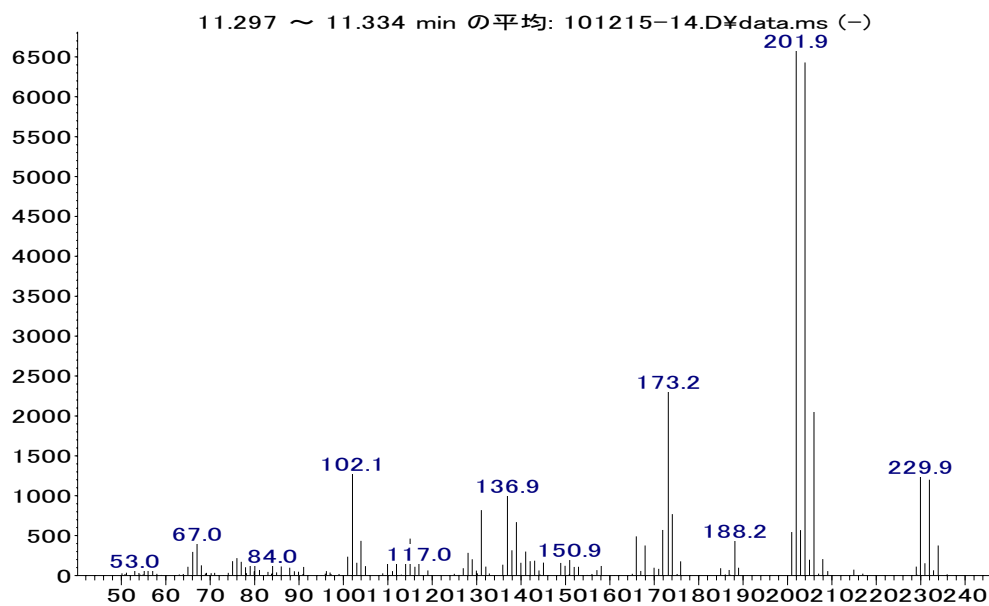


図 8-1 2,4,6-TCP-¹³C₆ エチル誘導体 (2,4,6-TCP-¹³C₆-EtO) のマススペクトル

アバダンス

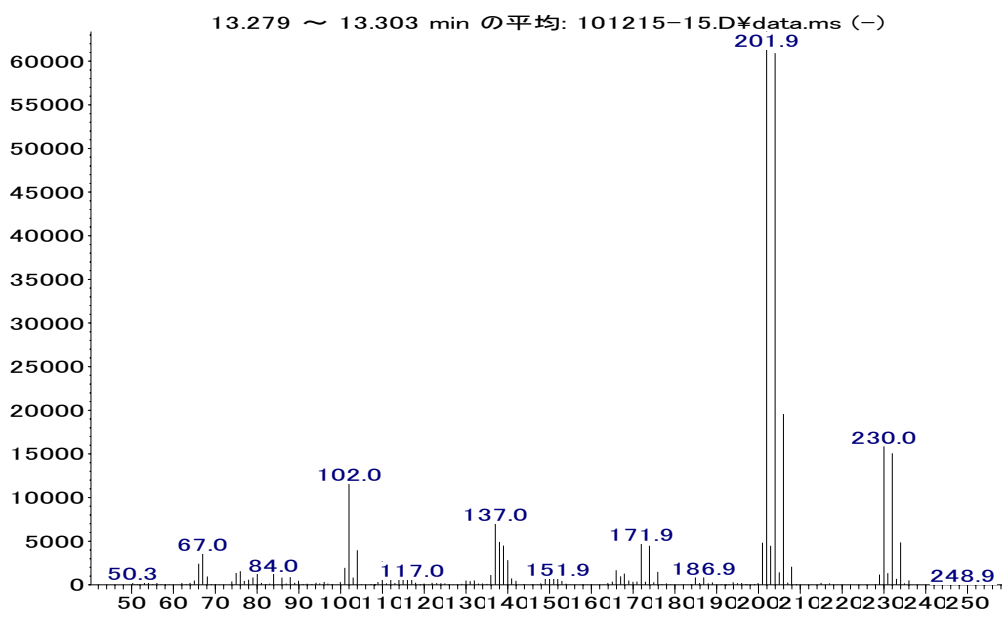


図 8-2 2,4,5-TCP-¹³C₆ エチル誘導体 (2,4,5-TCP-¹³C₆-EtO) のマススペクトル

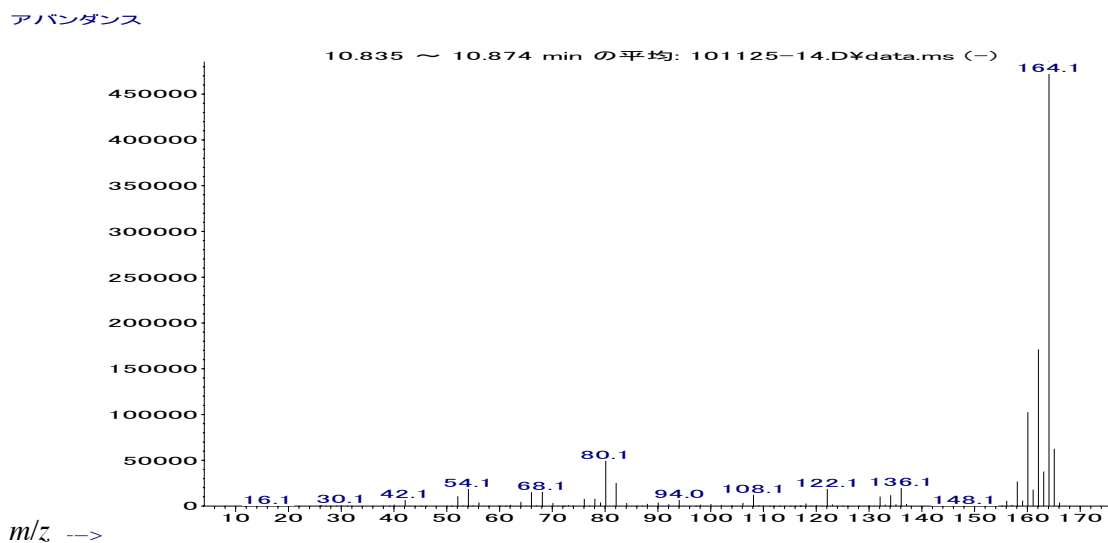


図9 ビフェニル- d_{10} のマススペクトル

〔操作ブランク〕

6つの異性体のうち、2,4,6-TCPのみ操作ブランクが検出されたため、本対象物質のみ操作ブランク試験を行った。生物試料5.0gのときの含水率を80%と仮定して、精製水4.0gの空試験の繰り返し測定結果を表7に示す。また、測定時のクロマトグラムを図10に示す。0.0091~0.018 ng/g-wetの操作ブランク値が検出され、スズキ試料から算出したMDL 0.012 ng/mLを超えるものもあった。操作ブランクの標準偏差は0.0033 ng/g-wet、一方、スズキ試料の標準偏差は0.0030 ng/g-wetであった。ほぼ同レベルであるが、要求感度や夾雑物等の影響を考慮して、スズキ試料から算出したMDLを採用した。しかしながら、MDLレベルでのブランク値が検出されるため、低減化することが望ましい。

表7 操作ブランク試験結果 (エチル誘導体として測定)

対象物質名	2,4,6-トリクロロフェノール	サロゲート回収率 (%)
試料	精製水	
試料量 (g-wet)	4.0	-
最終液量 (mL)	1.0	-
装置注入量 (μL)	1.0	
結果 1 (ng/g-wet)	0.0178	80
結果 2 (ng/g-wet)	0.0116	76
結果 3 (ng/g-wet)	0.0121	80
結果 4 (ng/g-wet)	0.0178	71
結果 5 (ng/g-wet)	0.0133	77
結果 6 (ng/g-wet)	0.00910	83
結果 7 (ng/g-wet)	0.0120	74
平均値 (ng/g-wet)	0.0134	77
標準偏差 (ng/g-wet)	0.003255	4.07
MDL (ng/g-wet)* ¹	0.013	-
MQL (ng/g-wet)* ²	0.033	-
CV (%)	24	5.3

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

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

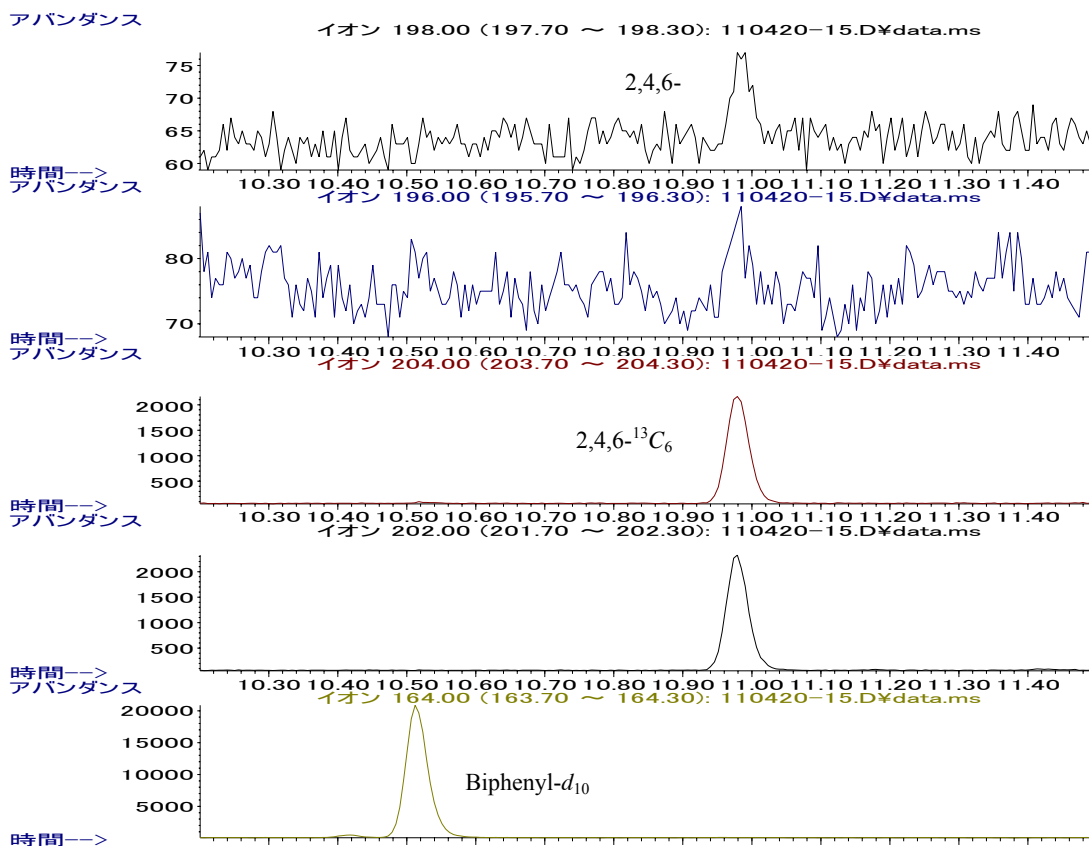


図10 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

スズキ試料に標準物質を添加して、一連の前処理操作を行い、無添加試料との差から添加回収率を算出した。その結果を表 8 に示す。2,4,6-TCP-EtO のみ操作ブランク及び無添加試料から検出された。添加回収試験試料のクロマトグラムを図 11 に示す。

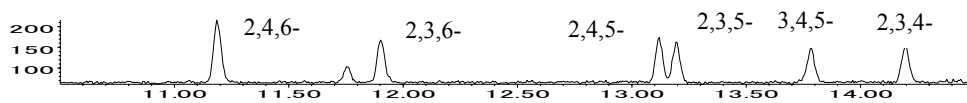
表 8 添加回収試験結果

物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	検体数	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係 数(%)	サゲート 回収率 (%)
2,4,6-TCP-EtO	5.0	操作 BL*	1	0.019	-	-	78
	5.0	無添加	1	0.037	-	-	109
	5.0	0.5	7	0.13	93	8.5	110
2,4,5-TCP-EtO	5.0	操作 BL	1	ND	-	-	86
	5.0	無添加	1	ND	-	-	115
	5.0	0.5	7	0.10	105	3.6	119
2,3,4-TCP-EtO	5.0	操作 BL	1	ND	-	-	-
	5.0	無添加	1	ND	-	-	-
	5.0	0.5	7	0.12	120	7.7	-
2,3,5-TCP-EtO	5.0	操作 BL	1	ND	-	-	-
	5.0	無添加	1	ND	-	-	-
	5.0	0.5	7	0.13	133	9.3	-
2,3,6-TCP-EtO	5.0	操作 BL	1	ND	-	-	-
	5.0	無添加	1	ND	-	-	-
	5.0	0.5	7	0.11	107	4.2	-
3,4,5-TCP-EtO	5.0	操作 BL	1	ND	-	-	-
	5.0	無添加	1	ND	-	-	-
	5.0	0.5	7	0.11	106	6.3	-

* : 操作ブランク

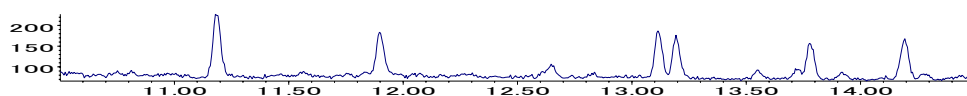
アバundance

イオン 198.00 (197.70 ~ 198.30): 110217-08.D\data.ms



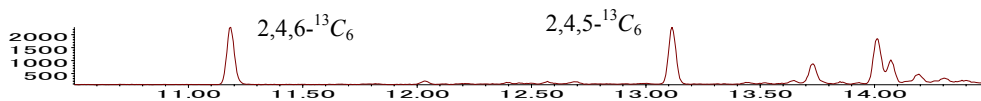
時間-->
アバundance

イオン 196.00 (195.70 ~ 196.30): 110217-08.D\data.ms



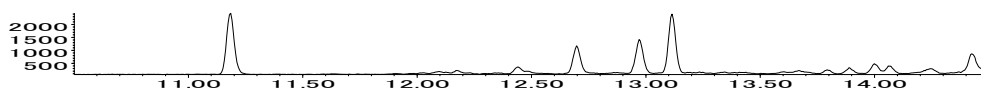
時間-->
アバundance

イオン 204.00 (203.70 ~ 204.30): 110217-08.D\data.ms



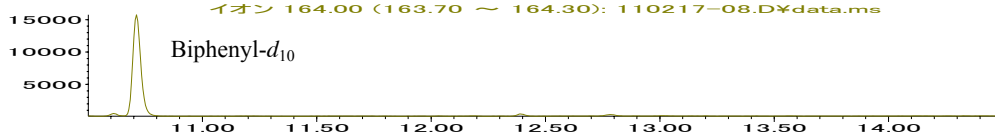
時間-->
アバundance

イオン 202.00 (201.70 ~ 202.30): 110217-08.D\data.ms



時間-->
アバundance

イオン 164.00 (163.70 ~ 164.30): 110217-08.D\data.ms



時間-->

図 11 添加回収試験試料のクロマトグラム

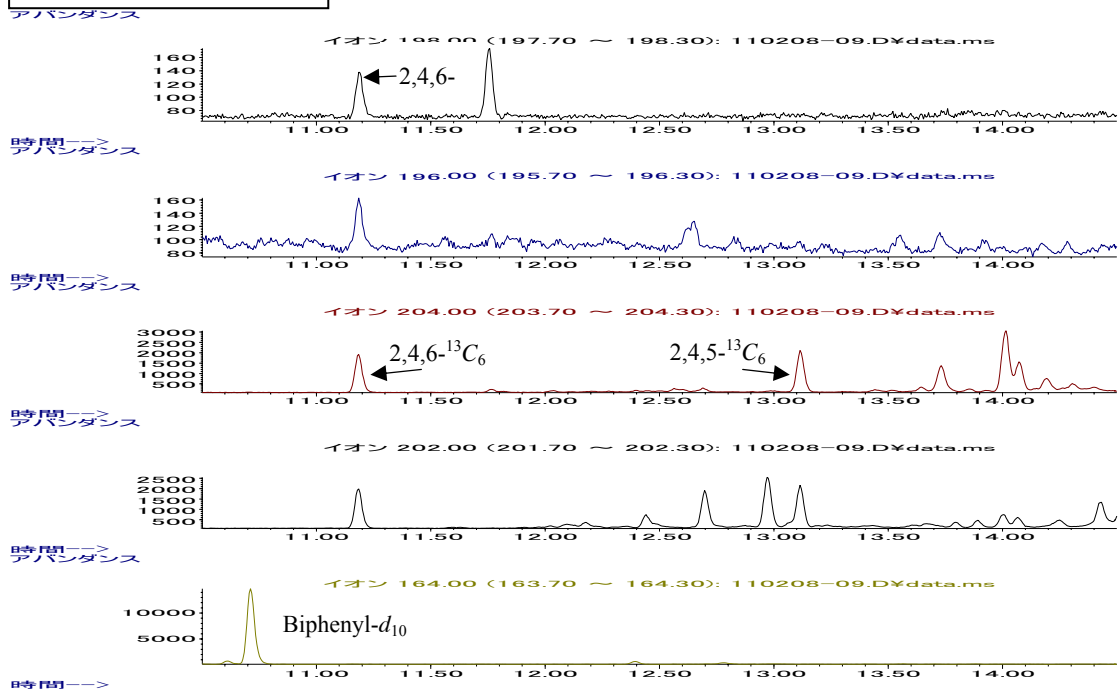
〔抽出方法の検討〕

メタノールを抽出溶媒としてホモジナイズ抽出し、ヘキサン分配により脱脂する方法、及び試料を 1 mol/L KOH/エタノールで一晩アルカリ分解する方法による 2 つの抽出方法を検討した。その結果を表 9 に示す。また、測定時のそれぞれのクロマトグラムを図 12 に示す。これらの方法による検討の結果、2,4,6-TCP-EtO が検出され、その他の異性体は検出されなかった。また、2 つの方法による検出濃度には大きな差はみられなかった。しかし、アルカリ分解ではサロゲート物質の回収率は 90%以上で良好であったが、ヘキサンへの液-液抽出時に大量のエマルジョンが発生し、分離操作に困難な面があった。また、図 12 から、メタノールホモジナイズ抽出の方が妨害成分を少なくすることができ、精製効果が高いことが判明した。以上の検討結果から、抽出にはメタノールホモジナイズ抽出を適用した。

表 9 ホモジナイズ抽出とアルカリ分解による抽出の結果 (各 n=2 での平均)

物質	ホモジナイズ抽出	アルカリ分解	サロゲート回収率 (%) (ホモジナイズ)	サロゲート回収率 (%) (アルカリ)
2,4,6-TCP-EtO	0.069	0.071	96	92
2,4,5-TCP-EtO	ND	ND	114	99
2,3,4-TCP-EtO	ND	ND	-	-
2,3,5-TCP-EtO	ND	ND	-	-
2,3,6-TCP-EtO	ND	ND	-	-
3,4,5-TCP-EtO	ND	ND	-	-

ホモジナイズ抽出



アルカリ分解

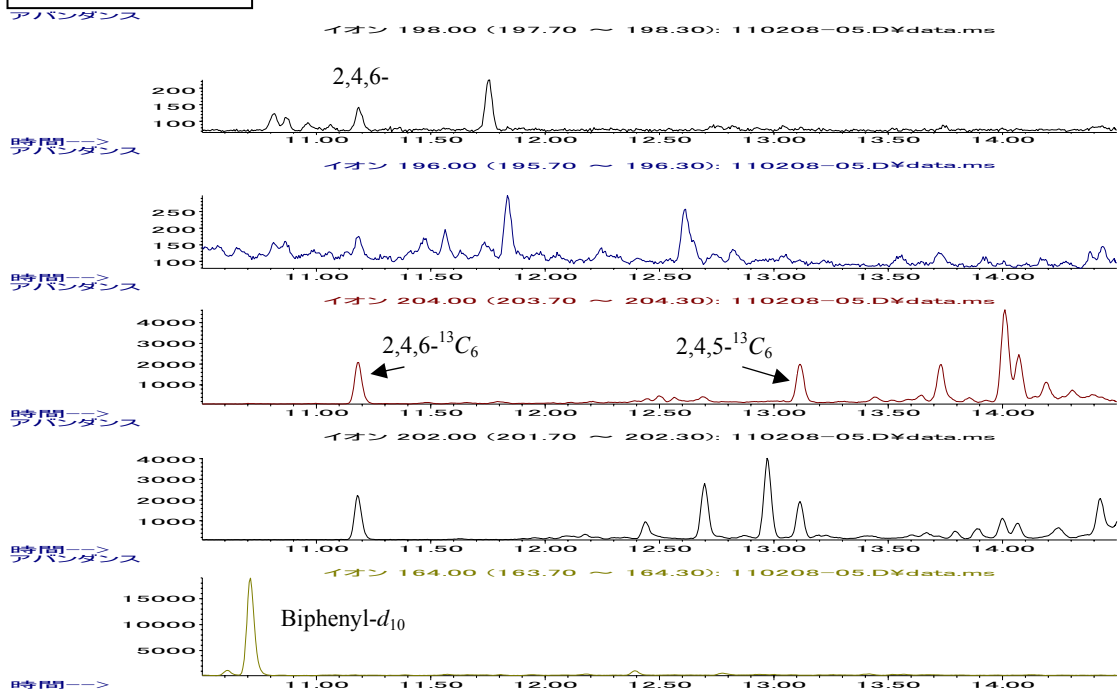


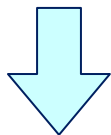
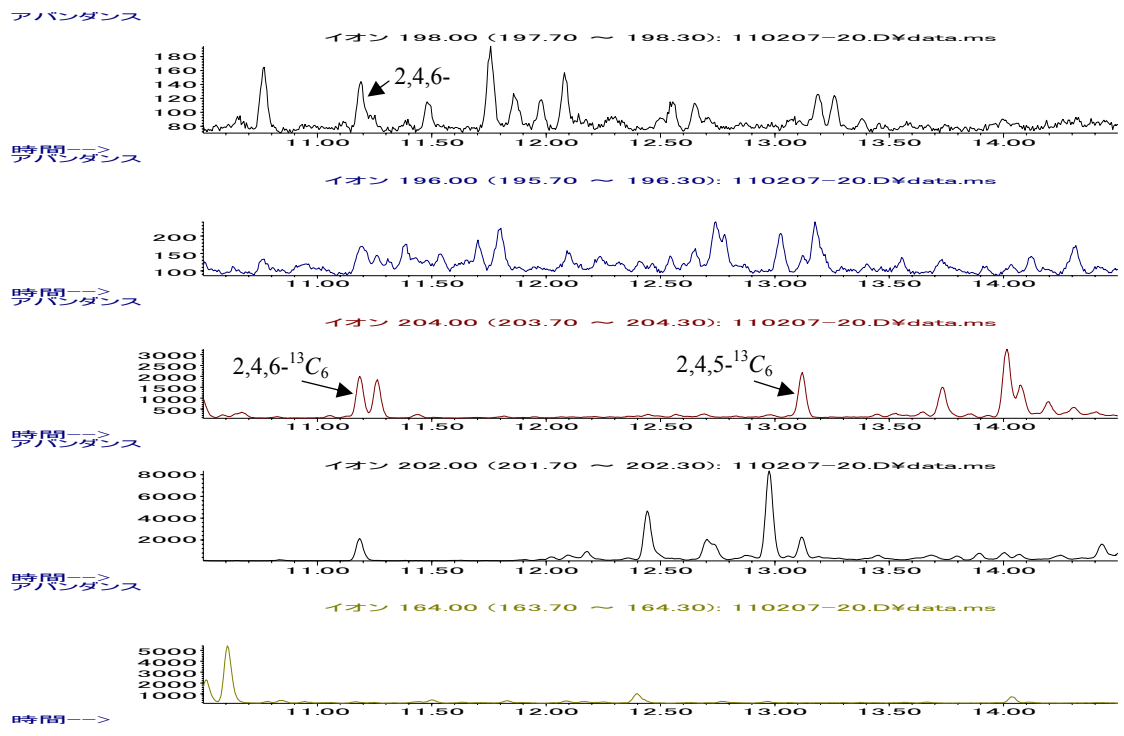
図 12 ホモジナイズ抽出とアルカリ分解による前処理後のクロマトグラム

〔44%硫酸シリカゲルカラムクリーンアップの検討〕

エチル誘導体化した後、残存脂質等の夾雑物を更にクリーンアップするために44%硫酸シリカゲルカラム (0.8 g) によるクリーンアップを検討した。カラム分画試験の結果を表10に示す。ヘキサンによってすべての異性体の溶出が確認され、溶出量はヘキサン12 mLとした。また、誘導体化した前処理液のカラム処理前、及び処理後のクロマトグラムを図13に示す。処理前は対象物質のモニターイオンに多くの妨害ピークがみられたが、処理後は除去された。また、2,4,6-TCP-¹³C₆-EtO 近傍の妨害ピークも除去され、カラム処理による精製効果が確認された。

表10 44%硫酸シリカゲルカラムの分画試験結果(TCP-EtO)

回収率 (%)	ヘキサン(mL)						合計 (mL)
	0 - 6	6 - 8	8 - 10	10 - 12	12 - 14	14 - 16	
2,4,6-	57	30	8.1	2.1	0.8	0	98
2,4,5-	97	1.1	0.5	0	0	0	98
2,3,4-	98	1.8	0	0	0	0	100
2,3,5-	97	1.3	0	0	0	0	98
2,3,6-	51	33	11	3.4	1.0	0	100
3,4,5-	98	0.8	0	0	0	0	99



44%硫酸シリカゲルカラム処理後

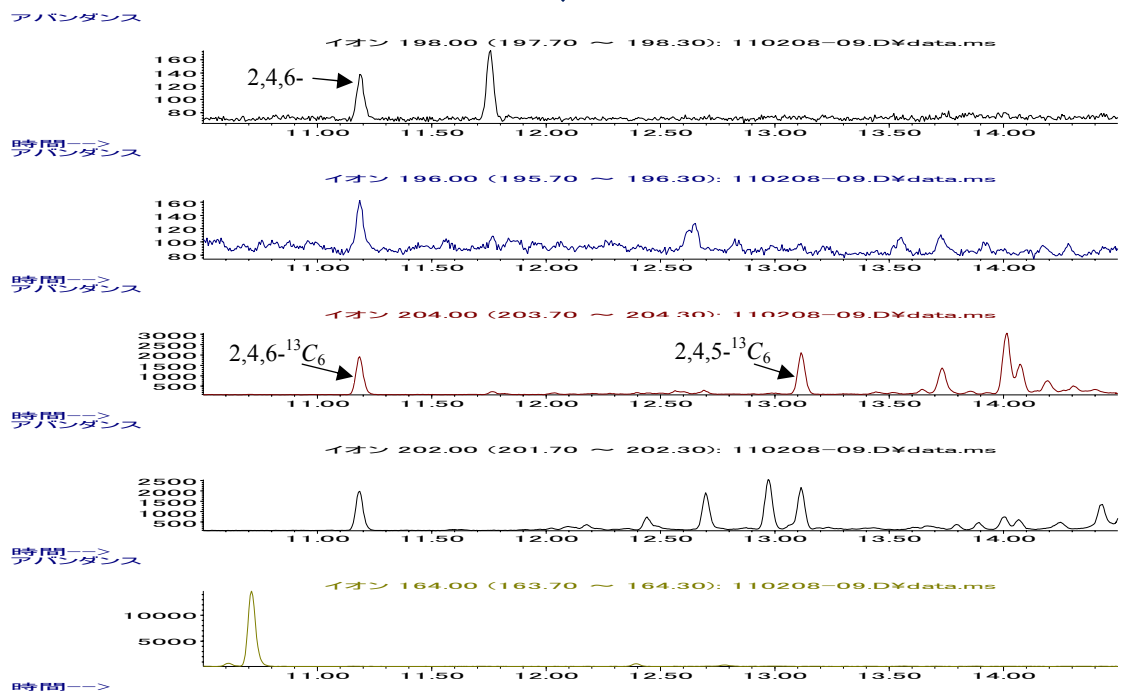


図 13 44%硫酸シリカゲルカラム処理による精製効果

〔環境試料の測定例〕

本法を用いてスズキ筋肉部を測定した結果、2,4,6-TCP は 0.019~0.037 ng/g-wet 検出され、他の化合物は未検出であった。測定したクロマトグラムを図 14 に示す。

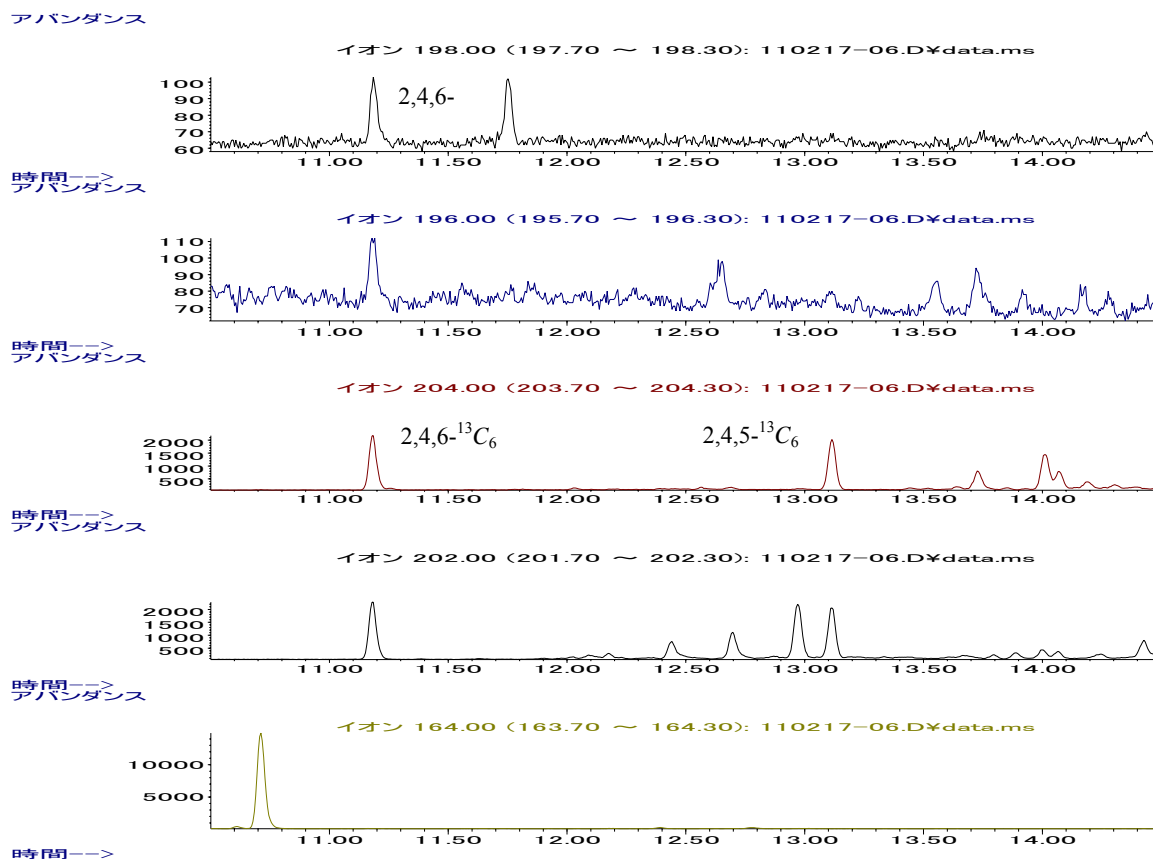


図 14 スズキ筋肉部のクロマトグラム

【評価】

本法は生物中の 2,4,6-トリクロロフェノール（別名：2,4,6-TCP）の分析に適用でき、MDL は 0.012 ng/g-wet、MQL は 0.030 ng/g-wet であった。スズキを用いた添加回収試験（添加量 0.5 ng）は 93%（サロゲート物質回収率 110%、変動係数 8.5%）であった。なお、本法は適切なサロゲート物質あるいは内標準物質を用いることで、2,3,4-トリクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノール、2,3,6-トリクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、3,4,5-トリクロロフェノールを含めた一斉分析に適用が可能である。

【参考文献】

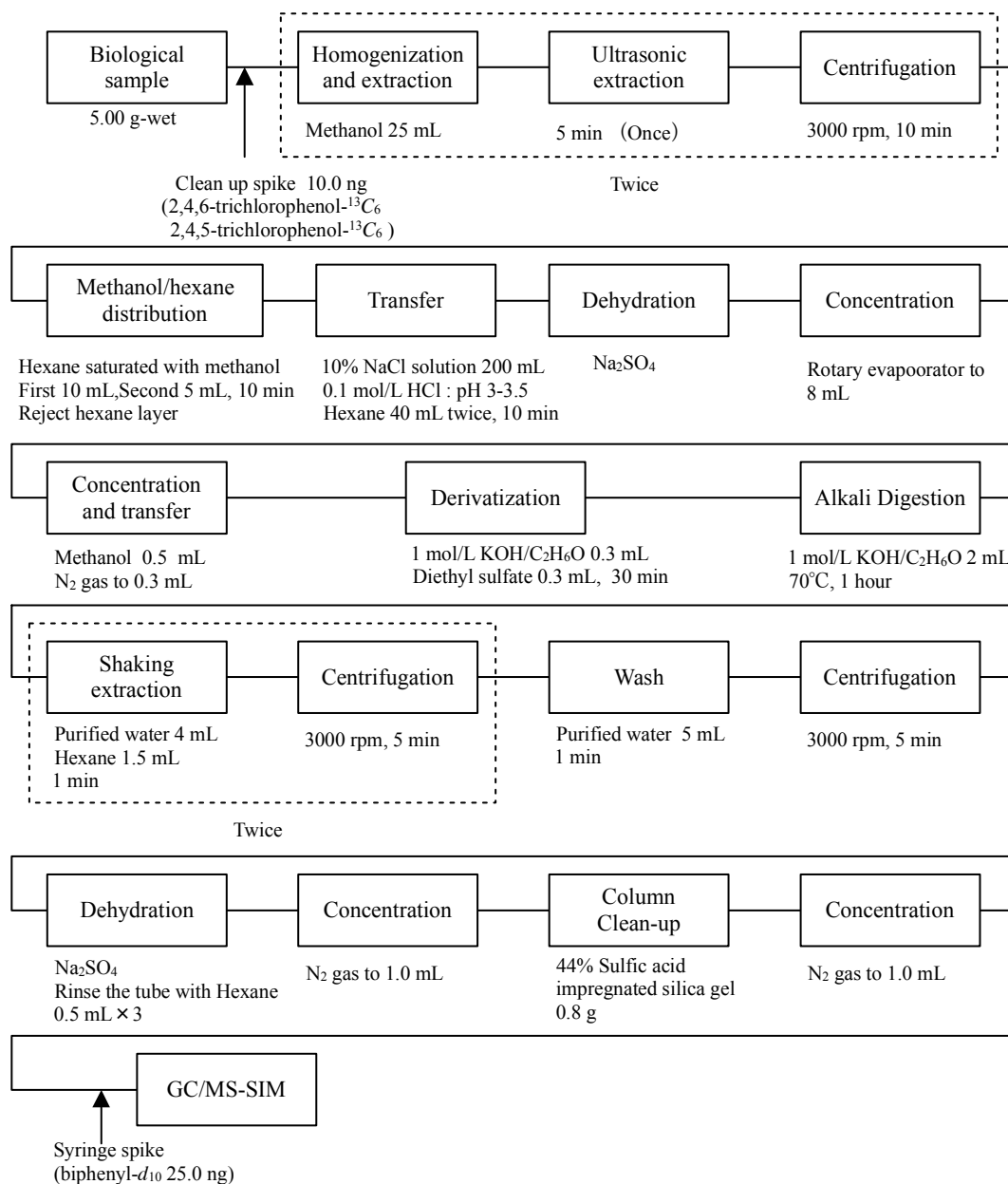
- 1) 要調査項目等調査マニュアル（水質、底質、水生生物），平成 14 年 3 月，環境省水環境部企画課

【担当者連絡先】

所属先名称 : 財団法人 日本環境衛生センター
所属先住所 : 〒239-0806 神奈川県川崎市川崎区四谷上町 10-6
TEL : 044-288-4905 FAX : 044-288-5232
担当者名 : 松本 幸一郎
E-mail : koichiro_matsumoto@jesc.or.jp

2,4,6-trichlorophenol

This method provides procedures for the determination of 2,4,6-trichlorophenol in biological samples by gas chromatography / mass spectrometry with selected ion monitoring (GC/MS-SIM). A 10.0 ng of 2,4,6-trichlorophenol- $^{13}\text{C}_6$ as surrogate was spiked into a 5.00 g of tissue sample from fish (*Japanese seaperch*). The sample was extracted twice with a 25 mL of methanol by homogenization and ultrasonication. Most of lipids in the extract were eliminated by a hexane/methanol partitioning technique, prior to derivatization with diethyl sulfate. The ethyl derivatives are extracted with hexane, followed by clean-up using a 44% sulfuric acid impregnated silica gel column chromatography. The eluate is concentrated to 1.0 mL by a stream of nitrogen gas and then spiked with a 25 ng of biphenyl- d_{10} as internal standard. Quantification was performed by GC/MS-SIM. The results of overall recovery tests at 0.5 ng of 2,4,6-trichlorophenol show that the mean recovery is 93% and its mean relative standard deviation is 8.5%. The instrument detection limit (IDL) is 0.0077 ng/g-wet. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) is 0.012 and 0.030 ng/g-wet, respectively.



物質名	分析法フローチャート	備考
2,4,6-トリクロロフェノール 別名： 2,4,6-TCP	<p>【生物】</p> <p>生物試料 5.00 g-wet</p> <p>クリーンアップスパイク添加 10.0 ng (2,4,6-trichlorophenol-¹³C₆ 2,4,5-trichlorophenol-¹³C₆)</p> <p>ホモジナイズ 溶媒抽出 メタノール 25 mL</p> <p>超音波抽出 5 min (1回目のみ)</p> <p>遠心分離 3000 rpm, 10 min</p> <p>2回繰り返す</p> <p>メタノール /ヘキサン分配 メタノール飽和ヘキサン 1回目 10 mL, 2回目 5 mL 振とう 10 min ヘキサン層廃棄</p> <p>転溶 10% NaCl, 200 mL 0.1 mol/L HCl で pH 3-3.5 ヘキサン 40 mL × 2 振とう 10 min</p> <p>脱水 Na₂SO₄</p> <p>減圧濃縮 ロータリー エバポレーター 8 mL</p> <p>濃縮・転溶 メタノール 0.5 mL 窒素気流下 0.3 mL</p> <p>誘導體化 5%含水 1 mol/L KOH/C₂H₆O 0.3 mL 硫酸ジエチル 0.3 mL 30 min</p> <p>アルカリ分解 5%含水 1 mol/L KOH/C₂H₆O 2 mL 70°C, 1時間</p> <p>振とう抽出 精製水 4 mL ヘキサン 1.5 mL 1 min</p> <p>遠心分離 3000 rpm, 5 min</p> <p>2回繰り返す</p> <p>水洗 精製水 5 mL 振とう 1 min</p> <p>遠心分離 3000 rpm, 5 min</p> <p>脱水 Na₂SO₄ ヘキサン洗い込み 0.5 mL × 3回</p> <p>濃縮 窒素気流下 1.0 mL</p> <p>カラム クリーンアップ 44%硫酸シリカゲル 0.8 g</p> <p>濃縮 窒素気流下 1.0 mL</p> <p>GC/MS-SIM</p> <p>シリンジススパイク添加 (ピフェニル-<i>d</i>₁₀ 25.0 ng)</p>	<p>分析原理： GC/MS-SIM</p> <p>検出下限値： 【生物】 (ng/g-wet) 0.012</p> <p>分析条件： 機器 GC：Agilent 7890 MS：Agilent 5975C カラム HP-1 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm</p>