

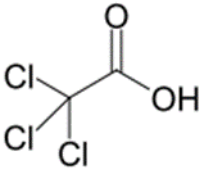
トリクロロ酢酸の測定・分析手法（GC 法）に関する
検討結果報告書

1. はじめに.....	- 3 -
2. 文献調査.....	- 3 -
3. 捕集および分析条件.....	- 4 -
3-2. 分析条件.....	- 4 -
3-2-1. 溶出誘導体化反応（メチルエステル化反応）.....	- 4 -
3-2-2. 実験フロー.....	- 5 -
3-2-3. 試薬詳細.....	- 5 -
3-2-4. 試薬調整.....	- 5 -
3-2-5. 分析条件.....	- 5 -
4. ブランク.....	- 6 -
5. 破過.....	- 6 -
6. 脱着率.....	- 6 -
7. クロマトグラム.....	- 7 -
7-1. 環境中の濃度計算.....	- 7 -
8. 検量線.....	- 8 -
9. 検出下限および定量下限.....	- 9 -
10. 回収率（通気試験）.....	- 9 -
11. 保存性.....	- 10 -
12. まとめ.....	- 11 -
13. 参考文献.....	- 11 -

1. はじめに

トリクロロ酢酸 (TCA) の物理化学的性状を示した¹⁾²⁾ (表 1)。

表 1 トリクロロ酢酸の物理化学的性状

CAS No.	76-03-9	
別名	Trichloroethanoic acid、Aceto-caustic、TCA	
用途	生化学用薬剤(DNA、RNA タンパク質沈殿剤) 除草剤(ナトリウム塩)、皮膚薬剤 (ケミカルピーリング剤)、表面処理剤 (金属表面)、尿中の有機塩素系曝露指標として代謝マーカーとして利用。	
構造式		
分子量	163.39	
物性	比重	1.6126 (64℃)
	沸点 (℃)	196.5
	融点 (℃)	57.5
	蒸気圧 (Pa)	21.3 (25℃)
	形状、特徴	常温で固体、光分解性あり、強酸性(pKa : 0.51)、腐食性
許容濃度等	日本産業衛生学会	未設定
	OSHA	—
	NIOSH (ppm)	1 (7 mg/m ³)
	ACGIH	
※TWA A3 (動物での発ガン性が認められるが人では認められない)		

気中濃度測定法として、NIOSH の 1 ppm (7 mg/m³) の 1/1000 から 2 倍の範囲における捕集および分析方法について検討を行った。

2. 文献調査

TCA は、OSHA 分析法 PV2017 において、固体捕集の二層式シリカゲル管(150/75 mg)を用いている。この方法の最大捕集量は 10 L (TLV : 1 ppm) と思われた。遊泳プールの塩素殺菌時に発生する副生成物調査として、大気捕集用として都健康安全研究センターの斎藤らは合成化学吸着材であるスチレンジビニルベンゼン共重合体である PoraPak-Q もしくは EmPore-Filter (3M) を用いて、30 L 通気捕集している。²⁾ この場合の回収率は Porapak-Q が 82.8%、Empore が 84.1%とされている。脱着溶媒は methanol-chloroform (1:1)を用い、メチルエステル化誘導体化剤は TMS-diazomethane を用いて、90%以上の回収率を示した。本報告²⁾での定量下限は TCA にて 0.1 µg/m³とされている。

3. 捕集および分析条件

3-1. 捕集条件

OHSA PV2017⁷⁾および東京都の方法²⁾を参考に、捕集剤はシリカゲルチューブ管 (520/260 mg 柴田科学製) を用い、TMS-diazomethane による誘導体化後に GC/MS を測定する方法を検証した。PV2017 法は通気量が少なく 10 L が上限のため感度が取れないため、より多く充填した二層式シリカゲル管を用いる事とした (図 1)。また GC/MS にて感度を得るために、捕集したトリクロロ酢酸に誘導体化を行い 1 ppb (7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) の空気濃度捕集が可能か検討した。捕集速度は 0.1 L/min 8 時間、48 L 捕集量をサンプリングの条件とした。

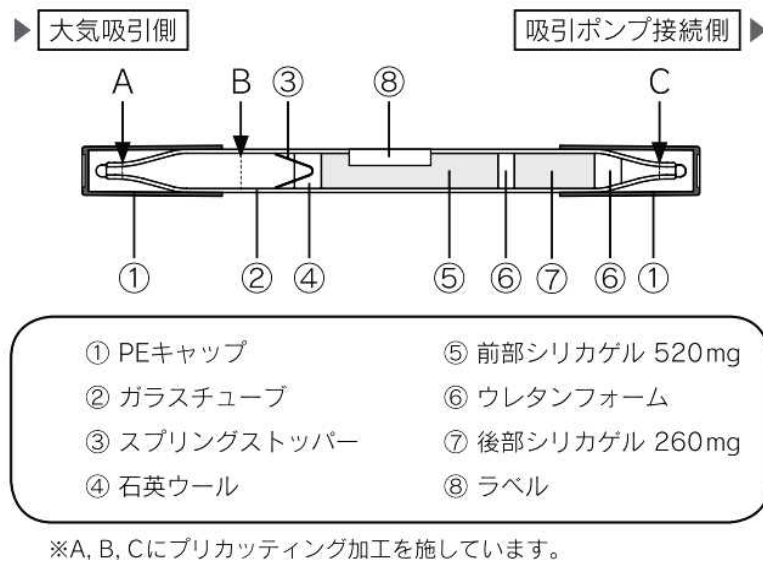


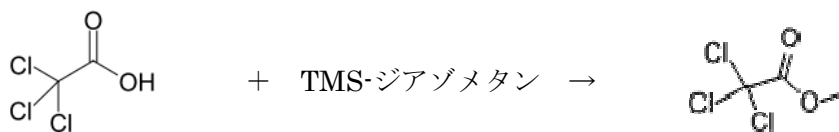
図 1 捕集管構成図⁸⁾

3-2. 分析条件

3-2-1. 溶出誘導体化反応 (メチルエステル化反応)

捕集管からの TCA の溶出はメタノールにて行う²⁾。メタノール 2 mL にて 520 mg および 260 mg のシリカゲルを個別に溶出させた。溶出は超音波 30 分間溶出した。その後、1 mL を分取し茶バイエルビンに入れ、クロロホルム 1 mL と誘導体化試薬 TMS-ジアゾメタン (原液) を 20 μL 添加しよく混ぜる。このとき内標準を使用するときは 1,2,3-トリクロロプロパン 1 μL (37 mg/mL) を添加する。良く振り混ぜ 60 分間静置し GC 用オートサンプラー用バイアルに 1 mL 入れ GC/MS (EI) 法により分析する。

本手法のメチルエステル化反応については、市販試薬である分析用 TMS-ジアゾメタン試薬はジアゾメタン発生装置を必要としないため、分析工程を簡易にできる。その他のハロ酢酸類に本法を適用させる場合には、分子量の大きさによりメチル化が不十分になる場合があるので注意する²⁾。



トリクロロ酢酸 (mp : 58°C bp:197°C)

トリクロロ酢酸メチル (mp :-18°C bp:152°C)

3-2-2. 実験フロー

以下にフロー図を示す。

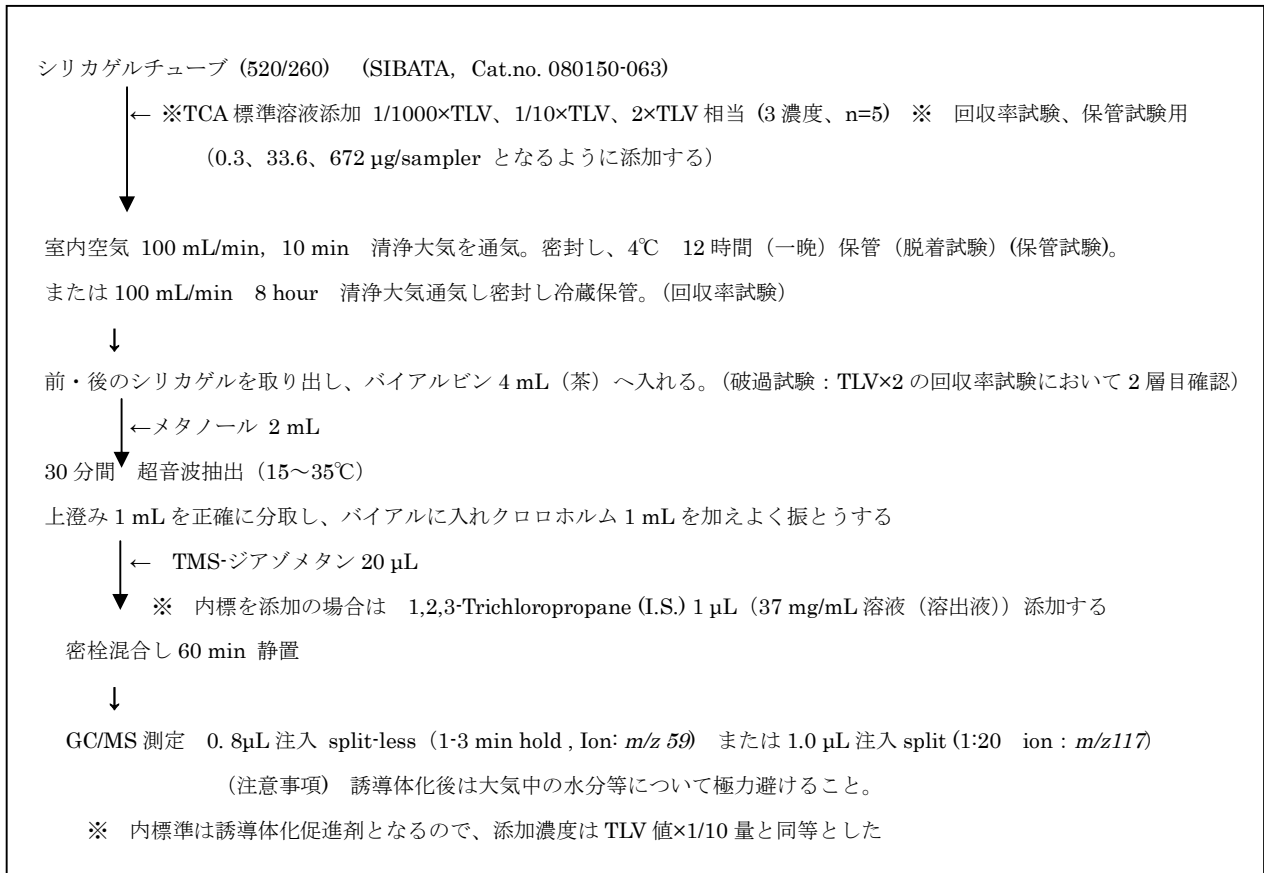


図 2 分析フロー図

3-2-3. 試薬詳細

- | | | |
|------------|------------------------|-------------|
| 1) 誘導体化用溶媒 | クロロホルム(HPLC 用) | (HPLC) 和光純薬 |
| 2) 抽出溶媒 | メタノール(HPLC 用) | (特級) 和光純薬 |
| 3) 標準用試薬 | トリクロロ酢酸 100 g | (試薬特級) 和光純薬 |
| 4) 誘導体化試薬 | TMS-ジアゾメタン 10%ヘキサン溶液 | (試薬) 東京化成 |
| 5) 内標準試薬 | 1,2,3-Trichloropropane | (試薬特級) 和光純薬 |

3-2-4. 試薬調整

- 1) クロロホルムメタノール(1:1)溶液 クロロホルムとメタノールを等容積混合する。
- 2) 検量線用標準溶液 0~0.336 mg/mL 範囲を調製する。希釈は抽出溶媒で行う。

※ 通気量 100 mL/min 240 min または 480 min 換算の場合 7
µg/m³ - 14 mg/m³

3-2-5. 分析条件

分析装置の条件を以下に示す。TLV の 1/1000 について、感度を維持し安定して定量するために

m/z59 を ion として split-less 法を用いた。但し、クロロ酢酸類を同時定量する場合には本物質の特異質量スペクトル（クロロカーボン側の m/z117）を用いる必要がある（図 5 参照）。

表 2 分析装置条件

ガスクロマトグラフ質量分析計	GC7890A MSD 5975C (Agilent)
使用カラム	HP-5MS 30m id=0.25mm, thin layer 0.25 μ m (Agilent)
Injection / MS Transfer / Detector / Ion sources	200/250/150/230 $^{\circ}$ C
カラム層温度	40 $^{\circ}$ C (2min hold) - 5 $^{\circ}$ C/min - 80 $^{\circ}$ C - 20 $^{\circ}$ C/min - 250 $^{\circ}$ C (5min hold)
キャリアガス	He (1.0mL/min)
導入法	SPLITLESS (1-3min) 1:20 または split 1:20
サンプル注入	0.8 μ L 高速モード または 1.0 μ L(split)
SIM モード質量 (定量/確認/親イオン:内標 m/z)	EI 59/117/119 : 75

4. ブランク

脱着溶媒および捕集材のブランクの確認を行ったところ、対象物質は認められなかった。図 3 にシリカゲルチューブからの脱着クロマトの一例を示した。



図 3 ブランククロマトグラフ(TIC クロマトグラフ)

5. 破過

TLV \times 2 の添加条件において、8 時間通気後 2 層目での確認を行ったところ確認はされなかった。

6. 脱着率

脱着率は、MDHS 33/2 の方法 κ に従う。NIOSH TLV 1 ppm (7 mg/m³) の 1/1000 から 2 倍の気中空気を 0.1 L/min で 8 時間吸引した時に、サンプラーに捕集される絶対量を算出し、その範囲の量となるように溶媒で調製した標準液を捕集管のフィルター部に添加し 10 分通気し脱着率を求めた。脱着率は約 90%となった。

TLV	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)	平均値 (%)	中央値	標準偏差	変動係数
×2	85.7	85.3	88.7	86.3	84.7	86.1	85.7	1.4	1.6
×1	96.9	88.6	94.4	88.5	84.1	90.5	88.6	4.6	5.1
×1/10	88.9	86.0	94.8	101.1	91.9	92.6	91.9	5.2	5.6
×1/1000	89.5	—	92.8	95.5	82.1	90.0	91.2	5.0	5.6

7. クロマトグラム

メチル化したトリクロロ酢酸の例を図4に示す。

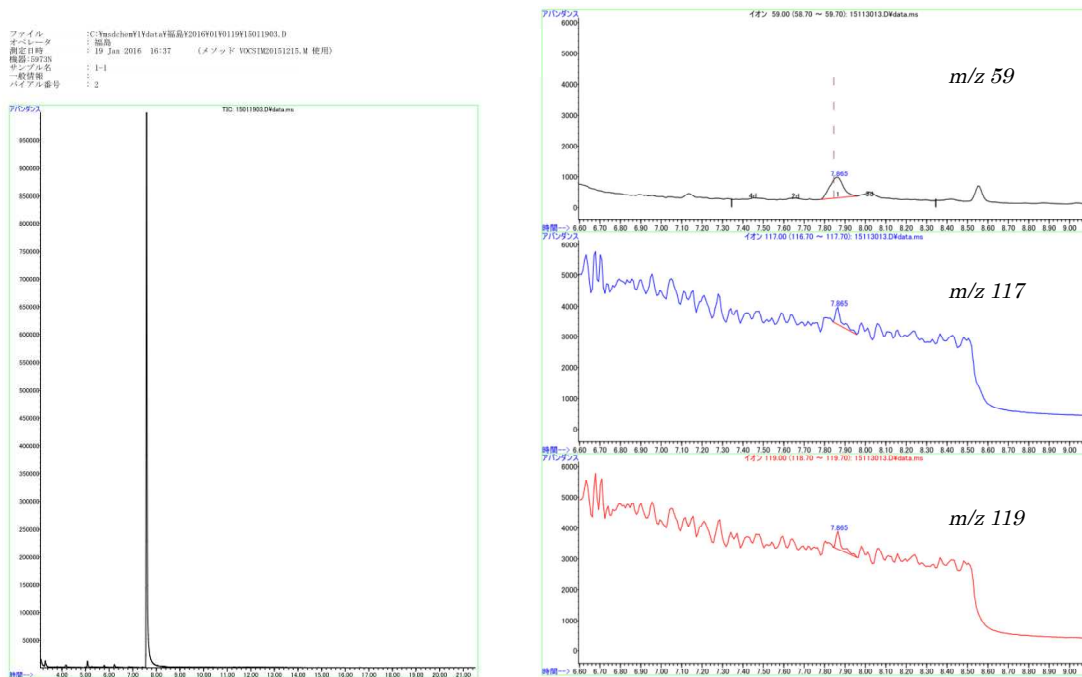


図4 クロマトグラム (標準溶液 670 µg/3 mL(TIC)、
および TLV×1/1000 濃度(SIM))

7-1. 環境中の濃度計算

$$C(\text{ppm}) = c \times (3/2) \times (24.47/163.39) \times (1/Q) \times (1/\varepsilon)$$

c : 最終試料液濃度 (µg/mL)

Q : 採取吸引量 (L)

ε : 回収率

3/2 : シリカゲルからの分取量

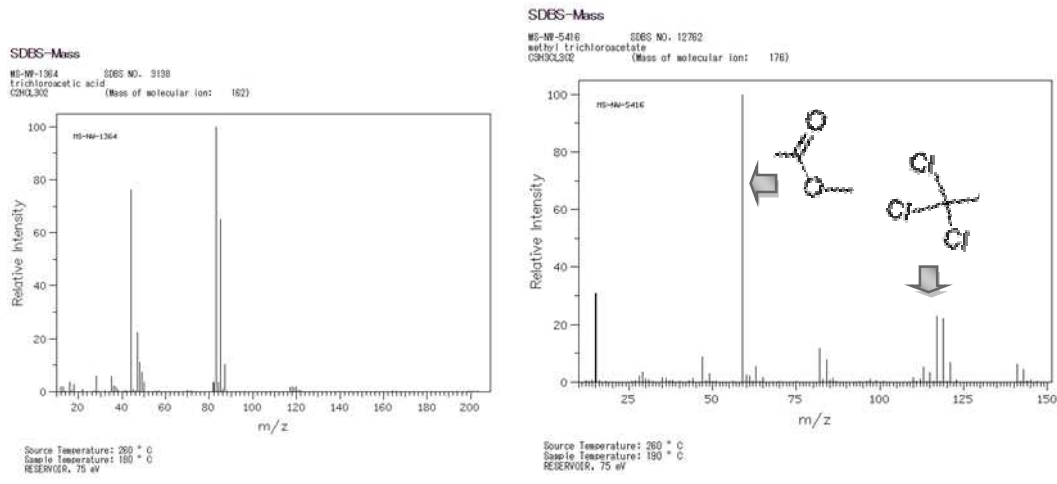


図5 MSスペクトル(トリクロロ酢酸およびトリクロロ酢酸メチル)

8. 検量線

標準液を溶出液にて希釈し 0.335、3.3、33.5、335、670 $\mu\text{g}/3\text{ mL}$ の5段階の標準系列を調製し、検量線の直線性について確認を行った。その結果、TLV $\times 2$ から 1/1000 まで直線性が得られた (図6)。

実際の測定では、測定範囲が1から1000倍では検量時の誤差が大きくなる為、検量線の範囲は2段(例 0.335~33 $\mu\text{g}/3\text{ mL}$ 、33~670 $\mu\text{g}/3\text{ mL}$) で作成し適応させるのが望ましい。

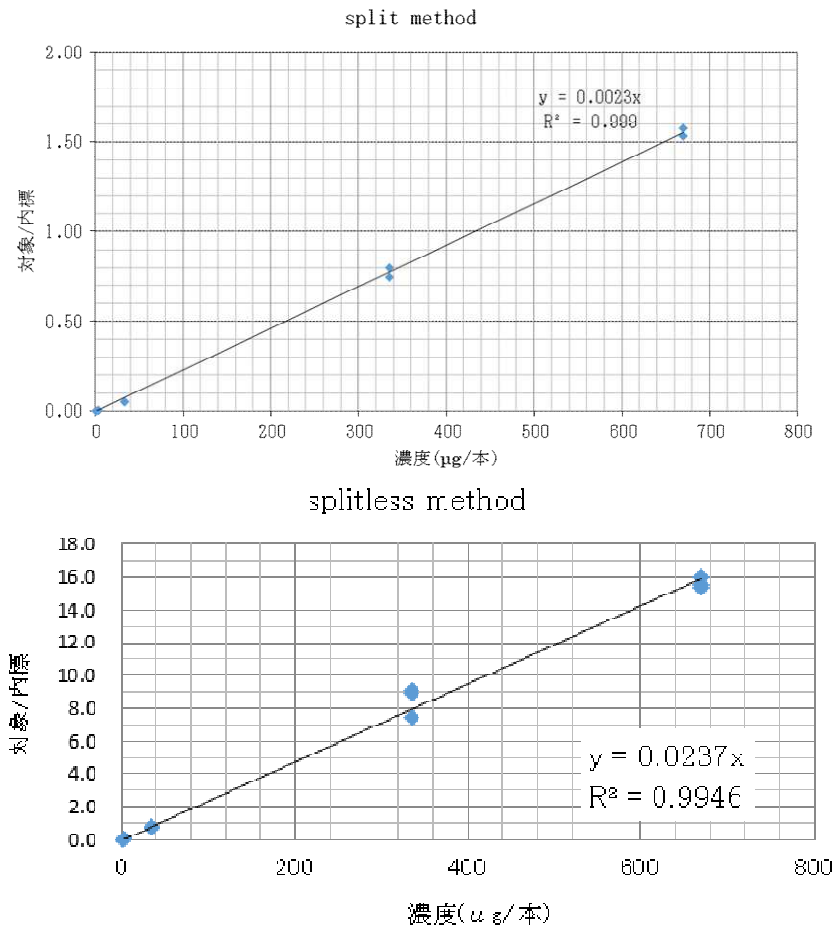


図6 トリクロロ酢酸メチルの検量線の一例 (SPLIT および SPLITLESS)

9. 検出下限および定量下限

検量線作成で調製した混合標準溶液の最低濃度 0.335 µg/ 3mL (0.1 L/min で 8 時間測定した場合； 気中濃度 0.007 mg/m³、TLV-TWA の 1/1000 に相当) を 5 サンプル分析し、その標準偏差 (SD) を算出した。得られた標準偏差から検量線を用い、次式より検出下限および定量下限を求めた (表 3)。

$$\text{検出下限 (}\mu\text{g/mL)} = 3 \text{ SD} \qquad \text{定量下限 (}\mu\text{g/mL)} = 10 \text{ SD}$$

その結果、検出下限および定量下限は表 4 に示すとおりとなった。定量下限値より求められる気中濃度は 48 L 採気で 0.0018 mg/m³ となり、TLV-TWA : 7 mg/m³ の約 1/4000 となり目標濃度を測定可能と示された。

表 3 繰り返し測定結果 m/z 59 (TLV1/1000 標準液)

	I	II	III	IV	V	標準偏差	検出下限値	定量下限値
							(µg/3mL)	
AREA	2717	2347	3943	3598	2346	0.009 (0.02)	0.026 (0.06)	0.087 (0.199)
濃度(µg/3mL)*	0.335	0.339	0.364	0.333	0.339			

※回帰式による値 括弧内 m/z 117 (スプリット法による値)

表 4 検出・定量下限

	検出下限値 (3SD)	定量下限値 (10SD)
溶液濃度 (µg/mL)	0.01	0.03
48L 採気時の気中濃度 (ppm)	0.54µg/m ³ (0.08ppb)	1.8µg/m ³ (0.26ppb)

※ 3mL 脱着とした場合の結果

10. 回収率 (通気試験)

シリカゲルに標準溶液を TLV×1/1000 から×2 倍の採取量となるように添加し、直ちに 0.1 L/min で 480 分間室内空気を吸引 (25°C, 13% (R.H.)) した。その後、脱着・分析を行い誘導体化後の回収率をそれぞれ求めた。(表 5)

表 5 添加回収率試験結果

	回収率 (%)	SD	CV (%)
添加 TLV/1000 (n=5)	57.4	5.8	10.1
添加 TLV/100 (n=5)	73.1	2.9	3.9
添加 TLV/1 (n=5)	83.8	5.7	7.0
添加 TLV×2 (n=5)	97.5	3.9	4.1

通気量は 48L 湿度 13%、温度 25-27°C

回収率は 1/100 以下では回収率は 80%以下を示した。窒素通気に於いても減少する(但し 10%程度向上)。

11. 保存性

10. 通気試験と同様に 0.1 L/min で 480 分間室内空気を吸引（常温、常湿）した後、両端をキャップし冷蔵庫（4℃）にサンプラーを垂直に立てて保存した。サンプル作製直後を（0 日目）とし、1、4、7 日後に脱着および分析し、保存性の確認を行った。（目標濃度×2；TLV×1/500 および第二評価値×2；TLV×2）。

表 6 保存試験

添加量	保存日数	測定値 (µg/本)	保存率 (%)
µg 添加 目標濃度×2 TLV/500	0	0.563	84.0
	1	0.488	72.8
	5	0.623	93.0
	7	0.568	84.8
µg 添加 第二評価値×2 TLV×2	0	633.5	94.6
	1	651.9	97.3
	3	637.8	95.2
	5	623.1	93.0
	7	613.1	91.5

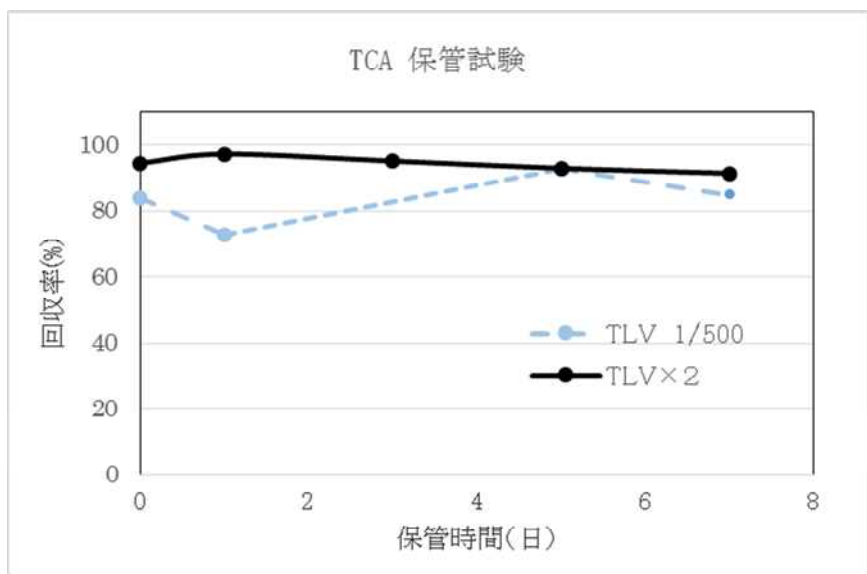


図 7 保管試験

保管試験では目標濃度である TLV×1/1000 の検出が出来なくなる状況になった。これは対象物質の分解や実験室大気内の夾雑物質により、TCA と同じ RT を示すピークを生じたため定量が困難となった。目標濃度 1/500 濃度での保管試験を実施した結果を（図-7）に示す。ここでは通気ブランクが発生するため TLV1/500 の分析値は変動を起こす。保管については TLV×2 から 1/500 までの濃度において、約 80%の保管安定性を 1 週間可能と示された。

1 2. まとめ

本検討の結果、トリクロロ酢酸を誘導体化により GC 法では、TLV×2 から 1/100 の濃度領域において良好に捕集できることと確認した。今回内標準を 1,2,3-トリクロロプロパンとしたが、同位体標準を用いることで、精度、感度ともに良好になると考える。また、これらの塩素系化合物が誘導化促進剤の役割を行っており厳密にする必要がある；内標準濃度や物質を変更する場合は誘導体化率が変わる。

また、スプリットレス法の場合トリクロロ酢酸特有の質量数イオンを感度良く得るため、その他のクロロ酢酸類を同時に分析する場合にはスプリットレス法が望ましい。

本 TMS アゾメタン誘導体を用いた分析は水分の混入が TMS 誘導体化合物を加水分解することが知られており、水分除去を行う事で安定した誘導体化反応を得る可能性がある⁹⁾。

本目標濃度 TLV 値 1/1000 であるトリクロロ酢酸 1ppb の測定については、捕集時に対象物質の減少やその他の誘導体化合物により妨害される可能性があると推測する。その為以下の検討が必要と思われる。

1、妨害物質の確認 2、湿度影響 3、所定空気量を通気したサンプルの誘導体化後の安定性

現状 TLV1/100(10 ppb)以下に本法を適用する場合は、現場大気での回収率を予め得ておく必要がある。

以上、検討結果を標準測定分析法として別紙にまとめた。

1 3. 参考文献

- 1) US EPA , Toxicological review of Trichloro-acetic Acid , In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS) , (Sep.2011) ;
EPA/635/R-09/003F ,<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0655tr.pdf>
- 2) 斎藤、大貫、「屋内プールにおける空气中ハロ酢酸類の測定」、東京都健康安全研究センター年報 (62) 219-225 (2011)
- 3) 河合俊夫 「労働検査に関わる最近の話題 (生物学的モニタリング)」, 労働衛生検査精度向上研究会資料：中央災害防止協会 大阪労働衛生総合センター (2010) ;
http://www.zeneiren.or.jp/cgi-bin/pdfdata/20100827_kawai.pdf
- 4) US EPA METHOD 552.1 ,DETERMINATION OF HALOACETIC ACIDS AND DALAPON IN DRINKING WATER BY ION-EXCHANGE LIQUID-SOLID EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH AN ELECTRON CAPTURE DETECTOR T R ev.1.0 (1992)
- 5) AIST SDBS Information No.: 3138 trichloroacetic acid
http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbno=3138
- 6) Mary E, Eide, OSHA PV2017(Partially Validated) Sampling and Analytical Method 2,2-dichloropropionic acid TriChloroacetic acid, (1990)
<https://www.osha.gov/dts/slrc/methods/partial/pv2017/2017.html>
- 7) MDHS 33/2 Sorbent tube standards. Preparation by the syringe injection technique., UK Health and Safety Executive Standards. 1983
- 8) シリカゲルチューブ Standard type 520/260mg (080150-0631) 取扱説明書、柴田科学
- 9) 片瀬、半谷：ガスクロマトグラフィーによる水中の微量 p-ークマル酸の定量法の検討、JAPAN ANALYST(23) 1211-1217 (1974)

(別紙)

トリクロロ酢酸標準測定分析法

化学式 : $C_2HCl_3O_2$	分子量 : 163.39	CASNo : 76-03-9
許容濃度等 : ACGIH (NIOSH) : 1 ppm (7 mg/m ³)	物性等 沸点 : 198°C 融点 : 58°C 蒸気圧 : 133 KPa (51.1°C) 形状 : 常温で固体	
別名 Trichloroethanoic acid、Aceto-caustin、TCA		
サンプリング		分析
サンプラー : シリカゲルチューブ (520/200 mg) (柴田科学 No.080150-063) サンプリング流量 : 0.1 L/min サンプリング時間 : 8 時間 (48 L) 保存性 : 添加量 0.67 および 670 µg において 冷蔵庫にて 5 日間保管可能		分析方法 : 固体吸着管採取 - 溶媒抽出後 誘導化反応 - GC/MS(EI) 脱着 : メタノール 2 mL 溶出 30 分超音波溶出後、1 mL 分取 クロロホルム 1 mL 添加 (内標準も加える) TMS 試薬 20 µL 添加、60 分静置 機器 : GC7890A MSD 5975C (Agilent)
精度		分析条件 :
脱着率 ; 添加量 0.67 µg の場合 90% ; 添加量 672 µg の場合 86% (0.1 L/min 8 時間 として)		カラム : HP-5 30 m id = 0.25 mm, thin layer 0.25 µm (Agilent) キャリアガス : He, 1.0 mL/min スプリット分析 1 : 20 (スプリットレス 1-3 分) オープン温度 : 40°C (2 min hold) -5°C/min -80°C- 20°C/min -250°C (5 min)
回収率 ; 添加量 0.67 µg の場合 57.4% 添加量 670 µg の場合 95.8% (0.1 L/min 8 時間 として)		注入口温度 : 200°C MS transfer : 250°C MS 温度 : 150°C Ion source : 230°C
Split (m/z 117) 検出下限 (3SD) : 0.18 ppb (1.25 µg/m ³) 定量下限 (10SD) : 0.6 ppb (4.2 µg/m ³)		定量イオン : 117(split), 59(splitless) 注入量 : 0.8 または 1.0 µL
Splitless (m/z 59) 検出下限 (3SD) : 0.08 ppb (0.54 µg/m ³) 定量下限 (10SD) : 0.26 ppb (1.8 µg/m ³)		検量線 : 0.42~4.2 µg/mL の範囲で直線性が得られている。 定量法 : 内標準法もしくは絶対検量線法
妨害 : ジクロロ酢酸、モノクロロ酢酸、2-ブタノール (m/z 59)		
適用 : その他のクロロ酢酸類にも適応可能 (溶出液の脱着効率、メチル化率が異なるので注意)。 現時点では TLV 1/100 濃度以下測定の場合は、実大気において回収率をあらかじめ確認することを推奨。		
参考 : OSHA Trichloroacetic acid PV2017 NIOSH 8322 Trichloroacetic acid (Urine) 上水試験方法 (2009) ,ハロ酢酸類試験方法 EPA Method 552.1,		

作成日 ; 平成 28 年 2 月 16 日