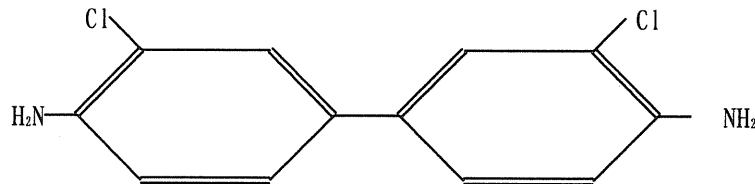


3,3'-ジクロロベンジジン

[対象物質名及び構造式]

3,3'-ジクロロベンジジン



[物性]

物質	分子量	沸点 ^{*)} (°C)	LogPow ^{*)}	水溶解度 ^{*)} (mg/100mL)
3,3'-ジクロロベンジジン	253.13	368	3.51	0.31

*) PhysProp Database

§1. 分析法

水質試料は、試料にサロゲートを添加後ジクロロメタンで抽出しN-メチルピストリフルオロアセトアミド (MBTFA) で誘導体化 (TFA化) し、GC/MS (SIM) により定量する。

底質試料は、試料にサロゲートを添加後アセトン抽出し、抽出液を酸性下でジクロロメタンにより溶媒洗浄した後、水層を中和後20%ジクロロメタン/ヘキサンで抽出し、N-メチルピストリフルオロアセトアミド (MBTFA) で誘導体化し、GC/MS (SIM) により定量する。

試験法

【試料の採取および保存】

「化学物質環境調査試料採取要領」に従う。前処理操作は、試料採取後速やかに行う。

【試料液の前処理】

[水質試料] 試料水500mLを1Lの分液ロートにとり、サロゲート (100ng/μLジクロロメタン溶液) 5μLと塩化ナトリウム15gを加え溶解後、ジクロロメタン50mLを加え5分間振とう抽出する。静置後、ジクロロメタン層を200mLの三角フラスコに分取し、水層には再度ジクロロメタン50mL加え、同様な操作を行う。

ジクロロメタン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターで3~5mLに濃縮し、10mLの試験管に移し窒素ガスを吹き付け約1mLまで濃縮し、試料前処理液とする。

[底質試料] 底質試料10gを50mL共栓付遠沈管に取り、サロゲート (100ng/μLジクロロメタン溶液) 5μLとアセトン20mLを加え、5分間振とう、10分間超音波抽出した後、3000rpmで10分間遠心分離して上澄みを分取後、再度アセトン20mLを加え同様に操作する。

この抽出液をあらかじめ1M塩酸250mLを入れた1Lの分液ロートに移し¹⁾、ジクロロメタン50mLを加え5分間振とうし、静置後ジクロロメタン層を捨て、再度ジクロロメタン50mLを加え同様に操作して溶媒洗浄する。水層に2M水酸化ナトリウム溶液約120mLを加え、注意

しながら混合して中和する。この時万能試験紙等により液性が中性からアルカリ性であることを確認する。もし、酸性の場合は2M 水酸化ナトリウム溶液を滴下し中性からアルカリ性に調整する。中和反応による発熱がおさまったら¹⁾、20%ジクロロメタン/ヘキサン50 mLを加え5分間振とう抽出する。静置後、有機層を200mLの三角フラスコに分取し、水層には再度20%ジクロロメタン/ヘキサン50mL加え、同様な操作を行う。

有機層を合わせ²⁾、無水硫酸ナトリウムで脱水しロータリーエバポレーターで3~5mLに濃縮後、10mLの試験管に移し窒素ガスを吹き付け約1mLまで濃縮し、試料前処理液とする。

【試料液の調製】

〔水質、底質試料〕 試料前処理液にN-メチルビストリフルオロアセトアミド (MBTFA) を100 μ L加え、室温で30分間誘導体化 (TFA化) する。反応終了後、窒素ガスを吹き付け0.1mLまで濃縮し³⁾、p-ターフェニル-d₁₄ (5ng/ μ L) を20 μ L加えジクロロメタンで1mLに定容しGC/MS (SIM) により定量する⁴⁾。以下、生成した誘導体を3,3'-ジクロロベンジジン (TFA体) とする。

【空試験液の調製】

水質試料は精製水500mLにサロゲートと塩化ナトリウムを添加し、水試料の前処理及び試料液の調製に従い操作する。

底質試料はアセトン40mLにサロゲートを加え、以下底質試料の前処理及び試料液の調整に従って操作する。

【標準液の調製】

〔検量線作成用標準液〕 3,3'-ジクロロベンジジン50mgをジクロロメタン50mLに溶かし、1000 μ g/mLの標準原液を作成する。標準原液をジクロロメタンで希釈し、20ng/ μ Lの標準液を作成する。

〔サロゲートの調製〕 3,3'-ジクロロベンジジン-d₆をジクロロメタンに溶かし、100ng/ μ Lを作製する。

〔内部標準液の調製〕 内部標準として使用するp-ターフェニル-d₁₄ 10mgをヘキサン100mLに溶かし (100 μ g/mL)、更に希釈し内部標準液 (5ng/ μ L) とする。

【測定】

〔GC/MSの測定条件〕

カラム : HP社製 HP-5 長さ : 30m、内径 : 0.25mm、膜厚 : 0.25 μ m
カラム温度 : 70°C (1分) - 20°C/分 - 200°C (0分) - 7°C/分 - 280°C (5分)
注入口温度 : 250°C
注入法 : スプリットレス法 (パージオン 1分)
キャリアガス : He 90KPa
モニター :

3,3'-ジクロロベンジジン(TFA体)	: 444 (定量用)、409 (確認用)
サロゲート	
3,3'-ジクロロベンジジン-d ₆ (TFA体)	: 450 (定量用)、415 (確認用)
内標準物質	
p-ターフェニル-d ₁₄	: 244

〔検量線〕

10mL試験管にジクロロメタン1mLを入れ、サロゲート (100ng/ μ L) を5 μ Lと3,3'-ジクロロベンジジン標準液を段階的 (0~10 μ L) に加え、MBTFAを100 μ L加え、室温で30分間誘導体化する。反応終了後、窒素ガスを吹き付け0.1mLまで濃縮し、p-ターフェニル-d₁₄ (5ng/ μ L) を20 μ L加えジクロロメタンで1mLに定容しGC/MS (SIM) に注入し、標準物質とサロゲートの濃度比とピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試料液をGC/MSに注入し、得られた目的物質とサロゲートのピーク面積比から検量線により検出量を求める。次に、検出量と分析に供した試料量から次項の計算式により試料中の濃度を算出する。また、目的物質と内部標準物質の面積比から回収率を算出する。

[計算]

$$\text{計算値} (\mu\text{g/L}, \mu\text{g/kg}) = \frac{\text{検出量} (\mu\text{g})}{\text{試料量} (\text{L}, \text{kg})}$$

[装置検出限界(IDL)]

本分析に用いたGC/MSの装置検出限界(IDL)を以下に示す。(注5)

物質	IDL (ng/mL)	濃縮率 (倍)	IDL濃度 ($\mu\text{g/L}$)
3,3'-ジクロロペンジジン	0.938	500	0.0019

[検出限界及び定量限界]

物質	水質 ($\mu\text{g/L}$)		底質 ($\mu\text{g/kg}\cdot\text{dry}$)
	検出限界	定量限界	検出限界
3,3'-ジクロロペンジジン	0.010	0.034	2.42

試薬・器具

【試薬】

3,3'-ジクロロペンジジン：東京化成⁶⁾

3,3'-ジクロロペンジジン-d₆：ケンブリッジアイソトープ^{ラホ} 5mg

p-ターフェニル-d₁₄：ケンブリッジアイソトープ^{ラホ} 1g

MBTFA：和光純薬

アセトン：残農試薬試験用

ヘキサン：残農試薬試験用

ジクロロメタン：残農試薬試験用

無水硫酸ナトリウム：残農試薬試験用

2M 水酸化ナトリウム溶液：試薬特級の水酸化ナトリウム80gを精製水に溶かし1L定容

1M 塩酸：精製水 1100mLに試薬特級の塩酸100mLを加える

精製水：MILLIPORE Milli-Q SP TOC

【器具】

振とう機：底質からの抽出に用いる。

超音波洗浄機：底質からの抽出に用いる。

遠心分離器：底質の抽出液の分離に用いる。

ロータリーエバポレーター：溶液の濃縮に用いる。

***** 注 解 *****

- 1) 発熱するので、冷えてから操作する。
- 2) 以後の操作で容器へ移す場合や洗浄の際はジクロロメタンを使用する。
- 3) 乾固させない。
- 4) 未反応のMBTFAによるGC/MSへの影響は確認されなかった。
- 5) 装置検出限界(IDL)は、平成11年度第16回環境科学セミナー「分析法開発時におけるIDL算定手順具体案」に従い、以下の通り算出した。
- 6) 現在、カタログ上見あたらない(他のメーカーも同様)、入手が困難と思われる。

物質名	3,3'-ジクロロペンジジン
注入濃度 (ng/mL)	10
結果 (1回)	10.0
結果 (2回)	9.2
結果 (3回)	10.1
結果 (4回)	9.0
結果 (5回)	9.9
結果 (6回)	9.2
結果 (7回)	9.1
標準偏差	0.483
IDL (ng/mL)	0.938
IDL試料濃度換算値 ($\mu\text{g/L}$)	0.0019
S/N	16
S/N適否	○
平均 (pg)	9.5
CV%	5.1

7) 検出限界および定量限界は「検出限界及び定量限界の算定方法」(昭和62年3月)により、次のとおり算出した。

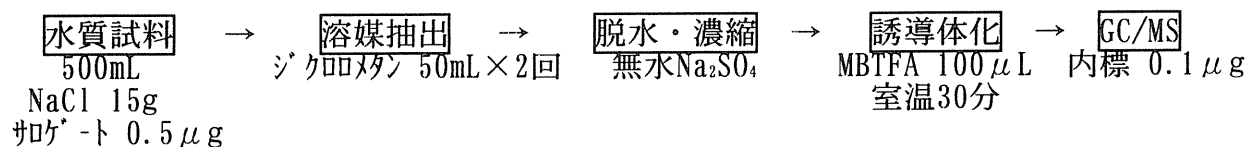
3,3'-ジクロロペンジジン

	水質			底質	
試料濃度 ($\mu\text{g/L}$)	0.04	0.08	0.16	検出限界推定値 ($\mu\text{g/kg}$)	5
応答値 (X)	0.0796	0.1747	0.3430	試料濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	11.4
標準偏差 (σR)	0.0031	0.0080	0.0026	分析値 ($\mu\text{g/kg}$)	10.3
検出力 (Dn)	0.0025	0.0058	0.0019	標準偏差 (σR)	0.77
検出限界 (D \times 3)	0.0102			検出限界 (DL)	2.42
定量限界 (D \times 10)	0.0339			95%信頼区間	1.55-5.33
不偏分散 (Fd)	9.69				

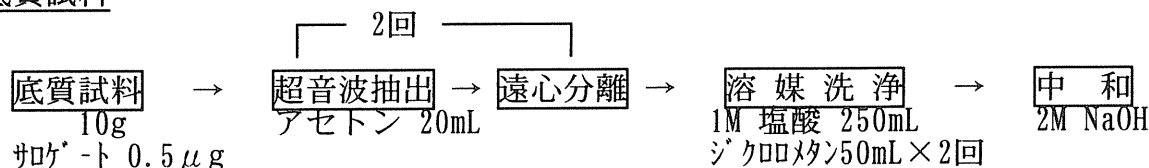
§ 2. 解説

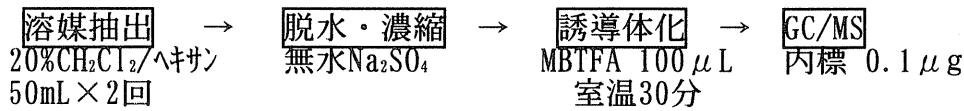
[分析法フローチャート]

水質試料



底質試料

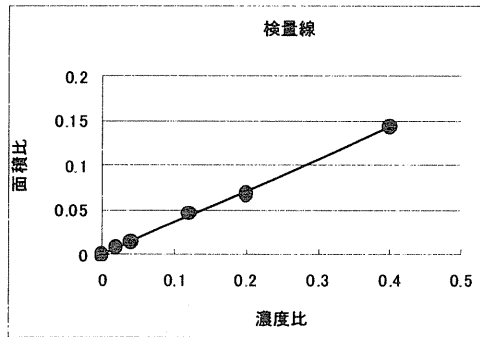




[分析法の検討]

1. 検量線

図1に検量線の一例を示す。



3,3'-ジクロロベンジジン : 0 ~ 200ng
 3,3'-ジクロロベンジジン-d₆ : 500ng

図1 検量線の一例

2. 低濃度添加回収実験

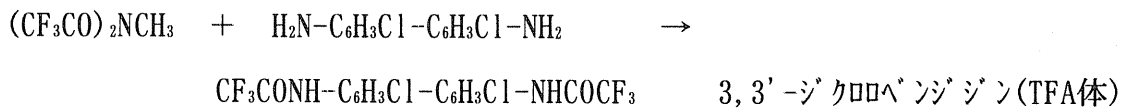
試料	精製水	河川水	海水	底質
試料量	500mL	500mL	500mL	10g
添加量(μg)	0.08	0.1	0.1	0.08
測定回数	4	3	3	7
3,3'-ジクロロベンジジン	95(3.9)	96(4.1)	89(1.3)	76(8.3)

(回収率%、かっこ内は変動係数%)

3. 誘導体化の検討

3,3'-ジクロロベンジジンは直接GC/MSに注入すると分離カラム等に吸着されppbレベルでの定量が困難であるため、MBTFAを用いてアミノ基をトリフルオロアセチル化(TFA化)しGC/MSで定量することとした。MBTFAによる誘導体化は、反応生成物及び副反応生成物に腐食性がなく揮発性の高いアミドとなるため、カラムの劣化やイオン源の汚染が少ないと云われている。

MBTFAによる3,3'-ジクロロベンジジンの誘導体化は以下の通りである。



3.1 誘導体化時間

標準品にMBTFAを加え、室温で誘導体化時間を検討した。

3,3'-ジクロロベンジジン¹は瞬時に誘導体化されると考えられるが、安定性を考慮して誘導体化時間を30分とした。

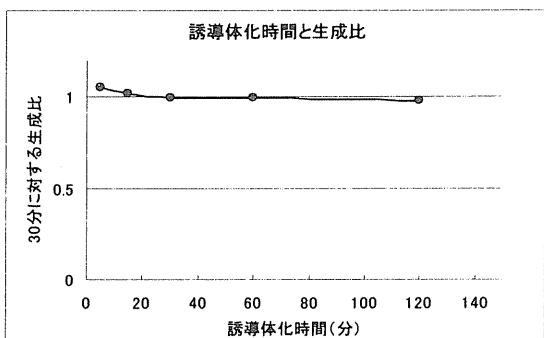


図2 誘導体化時間と生成比

3.2 誘導体化時の共存物質の影響

MBTFAによる誘導体化時の共存物質の影響を検討した。

アルコールとアルデヒドは誘導体化を阻害するが、100 μ Lの水分は共存しても影響されない。

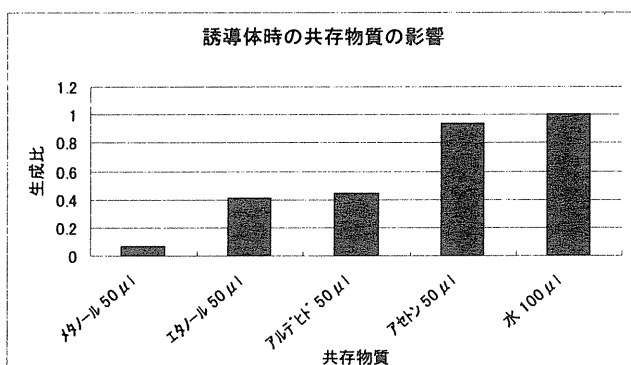


図3 誘導体化時の共存物質の影響

4. 水抽出方法の検討

4.1 抽出溶媒

精製水500mLに標準品を添加し各種溶媒50mLで2回抽出し、その回収率を図4に示した。

安定して抽出率の良いジクロロメタンを抽出溶媒とした。

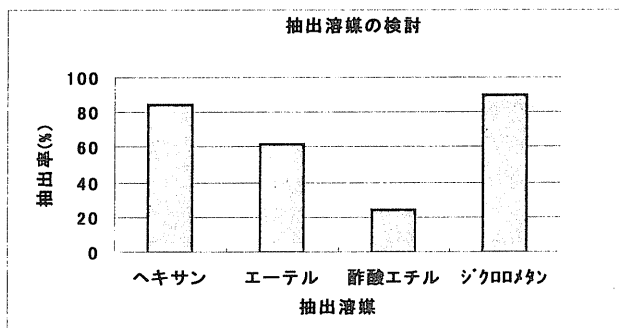


図4 抽出溶媒の検討

4.2 抽出時の液性の検討

4.1で最も抽出率の良いジクロロメタンを抽出溶媒として、精製水500mLに標準を添加し、液性と抽出率の関係を検討した。

pH 1.0以上で90%以上の抽出率、pH 0以下では抽出率が0%であり、この領域でのクリーンアップが期待できる。

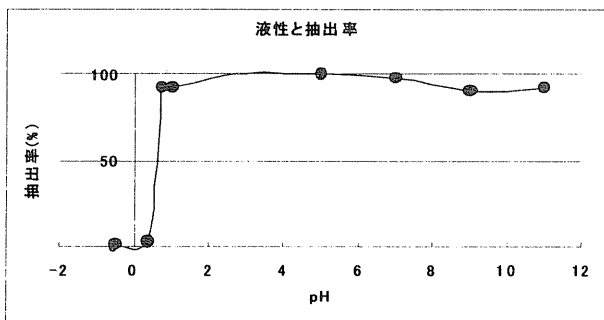


図5 液液抽出時の液性の検討

5. 底質試料の検討

5.1 抽出溶媒の検討

底質試料に標準を添加し、抽出溶媒を検討した。抽出溶媒はアセトンが最も良い回収率で、共通底質（含水率30%）76%、諏訪湖底質（含水率78%）では20%程度であった。

なお、諏訪湖底質で標準物質添加直後の回収率は約50%であった。

また、共通底質に水分を添加して検討したが、水を加えない状態での回収率と同様であり、底質の含水率と回収率に関係は認められなかった。

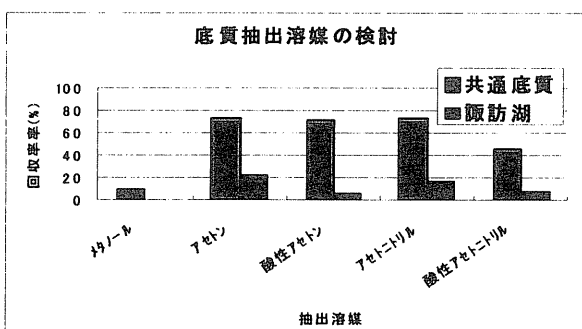


図6 底質からの抽出溶媒の検討

5.2 カラムによるクリーンアップ

底質試料は抽出時の溶媒洗浄による前処理で酸性、中性の妨害物質の多くは除去されるが、更にクリーンアップが必要な場合のカラムによるクリーンアップ方法を検討した。

誘導体化後ヘキササン10mLでコンディショニングしたシリカカートリッジに誘導体化後の試料をロードし、ヘキササン5mLと1%アセトン/ヘキササン5mLで洗浄後、10%アセトン/ヘキササン10mLで溶出する。

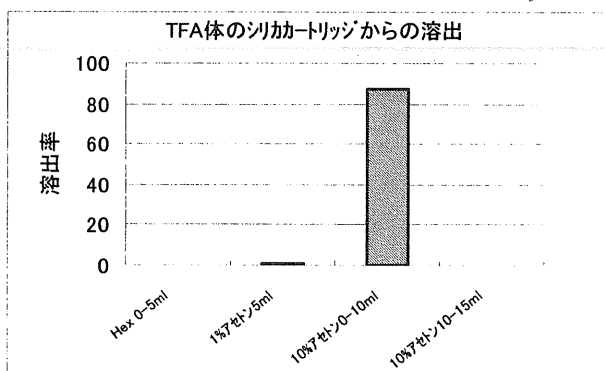


図7 シリカカートリッジの溶出パターン

6. 分解性スクリーニング試験

(愛知県公害調査センター：平成6年度)

物質	経過時間	1 時間 後			5 日 後			
	pH	5	7	9	5	7	9	7(明所)
3,3'-ジクロロベンジジン		96	99	98	99	100	99	78

(初期濃度 2 μg/mLでの残存率, %)

7. マススペクトル

分析対象物質とサロゲートのTFA化後のマススペクトルを図8~9に示す。

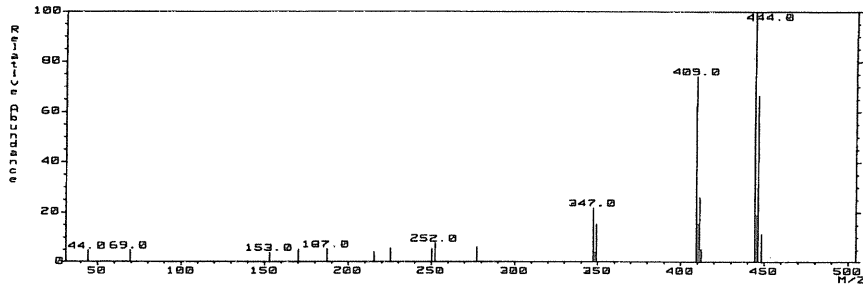


図8 3,3'-ジクロロベンジジン (TFA体)

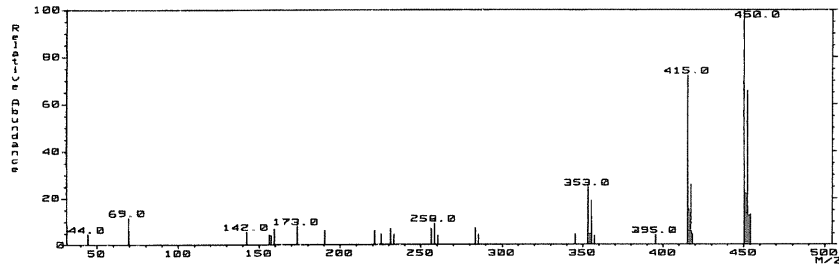


図9 3,3'-ジクロロベンジジン-d₆ (TFA体)

8. SIMクロマトグラム

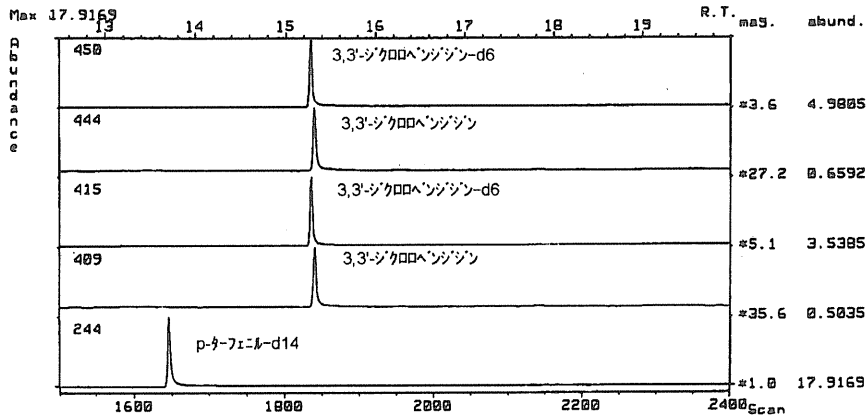


図10 標準物質

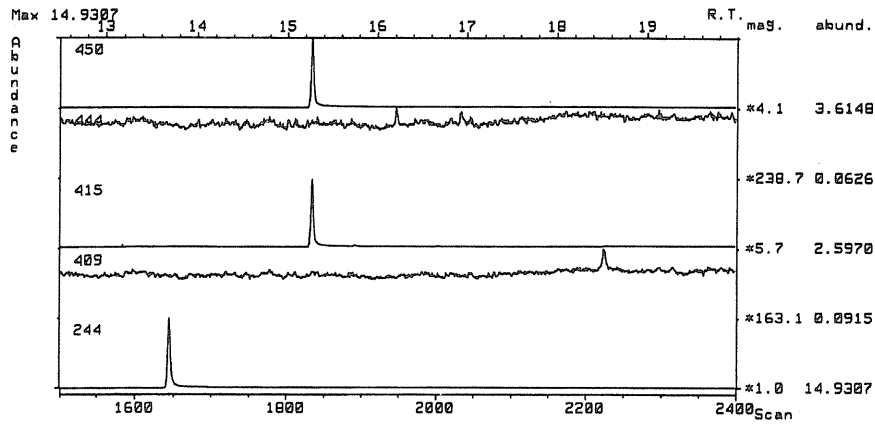


図11 精製水ブランク

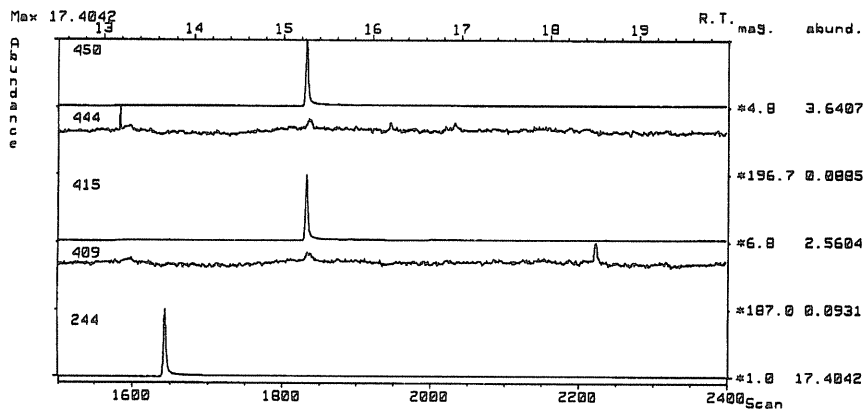


図12-1 河川水 (無添加)

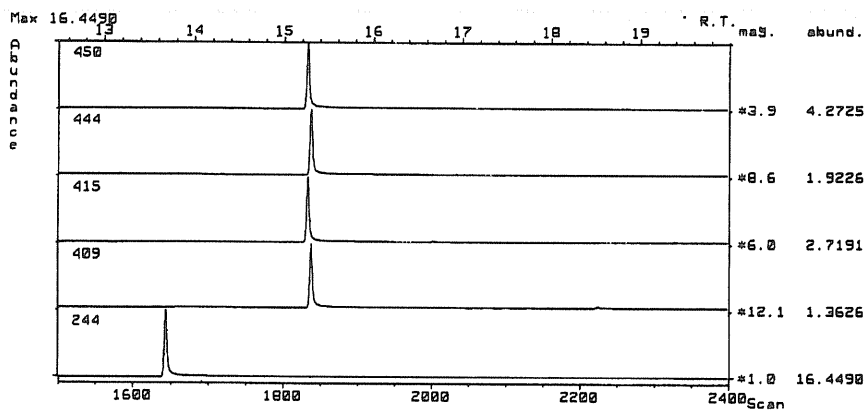


図12-2 河川水 (標準物質添加)

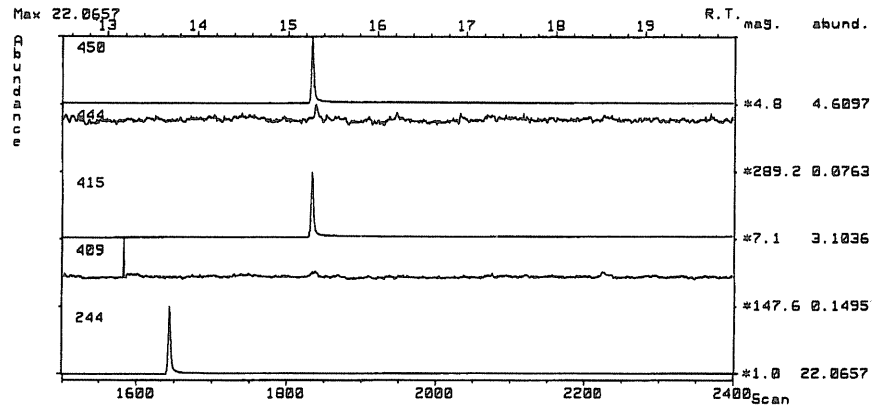


図13-1 海水（無添加）

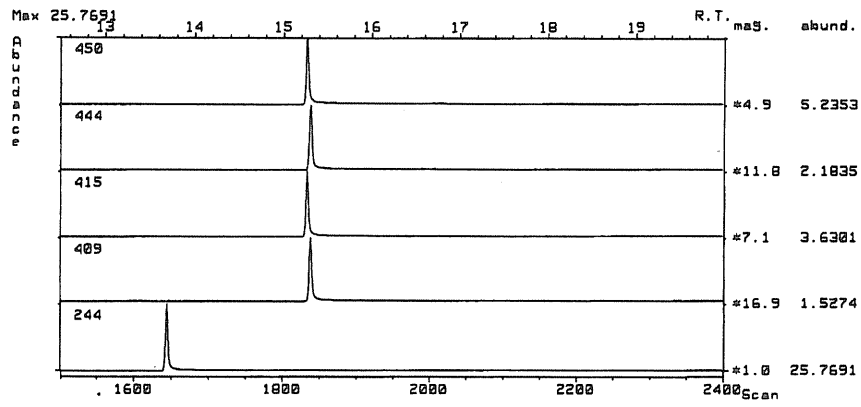


図13-2 海水（標準物質添加）

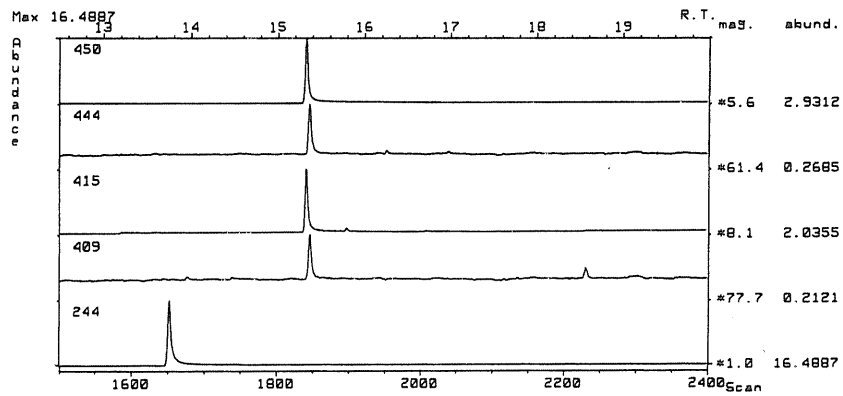


図14-1 共通底質（無添加）

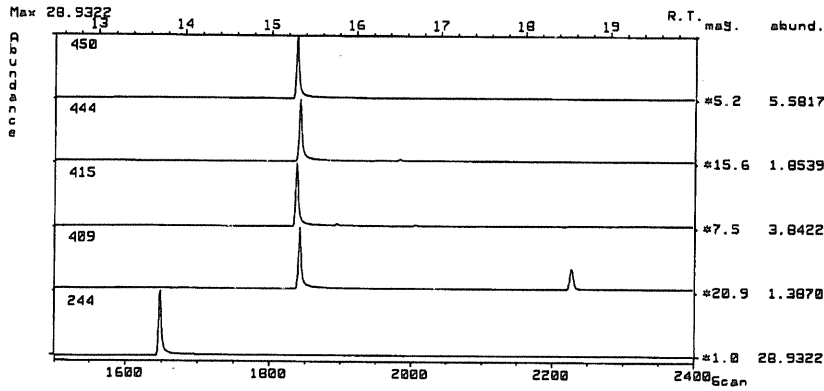


図14-2 共通底質（標準物質添加）

9. 考 察

本法により水質に0.01ppbレベルで存在する3,3'-ジクロロベンジジンの定量が可能である。

本法により環境中の3,3'-ジクロロベンジジンを分析した結果、河川水、海水では不検出、共通底質から4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{dry}$ 検出された。

参考文献

環境庁 環境保健部 保健調査室：平成元年度 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：平成6年度 化学物質分析法開発調査報告書

担当 長野県衛生公害研究所

住所：〒380-0944 長野市安茂里米村1978

TEL：(026) 227-0354

FAX：(026) 224-3415

担当者：笹井 春雄、細井 要一、篠原 邦和

分析試料の送付

〔水質試料〕 試料をヘッドスペースの残らないようにガラス瓶に入れ、クール便で送付する。

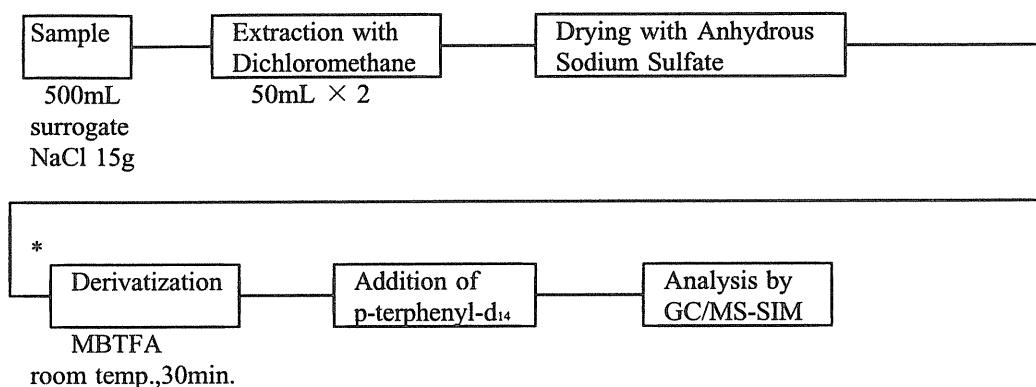
〔底質試料〕 均一化した試料をガラス瓶に入れ、クール便で送付する。

Target Compound

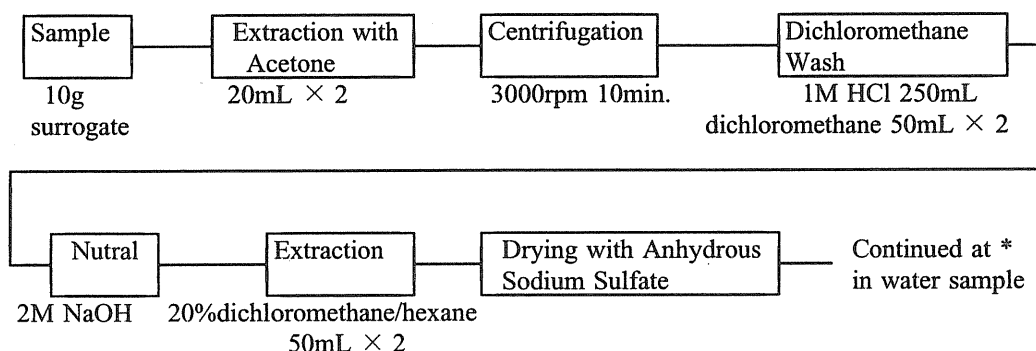
3,3'-dichlorobenzidine

1. Flowchart

(Water sample)



(Sediment Sample)



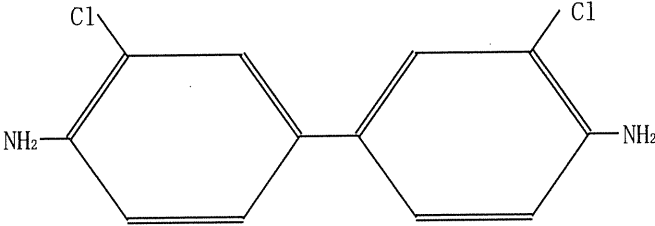
2. ABSTRACT

A water sample spiked with 3,3'-dichlorobenzidine-d₆ as a surrogate was extracted with dichloromethane. The dichloromethane phase was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and then concentrated to 1mL, and derived by MBTFA. The analytes were added internal standard and then measured by GC/MS.

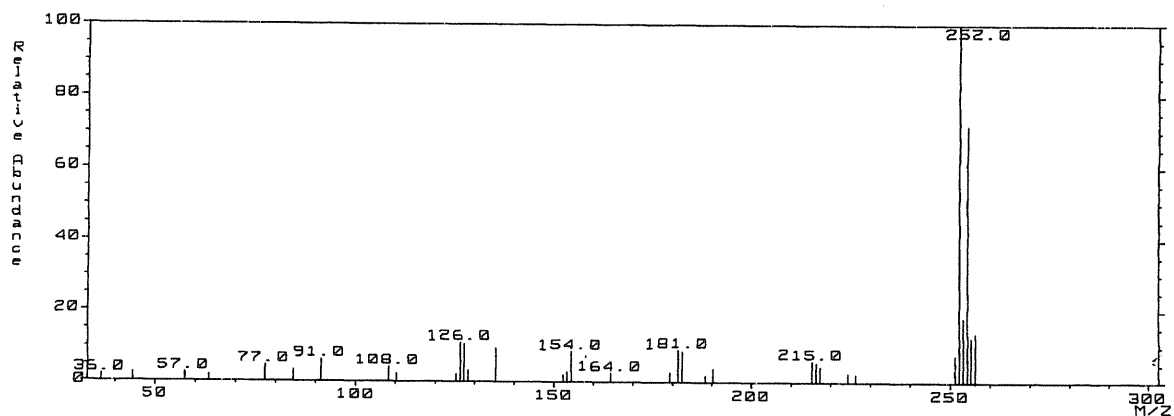
A sediment sample spiked with the surrogate compound was extracted with acetone. The extract in 250mL of 1M hydrochloric acid was washed with dichloromethane and then neutralized with 2M sodium hydroxide solution. The solution was extracted with 20% dichloromethane/hexane. The extract was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and then concentrated to 1mL, and derived by MBTFA. The analytes were added internal standard and then measured by GC/MS.

物質名	分析法フローチャート	備考
3,3'-ジクロロベンジジン	<p>水質</p> <pre> graph LR A[試料] --> B[溶媒抽出] B --> C[脱水] C --> D[TFA化] D --> E[GC/MS] </pre> <p>500mL ジクロロメタン 50mL × 2 無水 Na₂SO₄ NaCl 15g サラダ油 0.5 μg</p> <p>MBTFA 100 μL 室温 30分 p-ターフェニル-d₁₄ 0.1 μg</p> <p>底質</p> <pre> graph LR A[試料] --> B[抽出2回] B --> C[遠心分離] C --> D[溶媒洗浄] D --> E[中和] E --> F[溶媒抽出] F --> G[脱水] G --> H[TFA化] H --> I[GC/MS] </pre> <p>10g サラダ油 0.5 μg アセトン 20mL 振とう 5分、 3000 rpm 超音波 10分</p> <p>1M HCl 250mL 20%ジクロロメタン/Hex ジクロロメタン 50mL 2回 2M NaOH 50mL 2回</p> <p>無水 Na₂SO₄ MBTFA 100 μL 室温 30分 p-ターフェニル-d₁₄ 0.1 μg</p>	<p>GC/MS カラム : HP-5 カラム長 : 30m 内径:0.25mm 膜厚:0.25 μm</p> <p>検出限界 :</p> <p><u>水質</u> (μg/L) 0.01</p> <p><u>底質</u> (μg/Kg·dry) 2.42</p>

マススペクトル付属データ

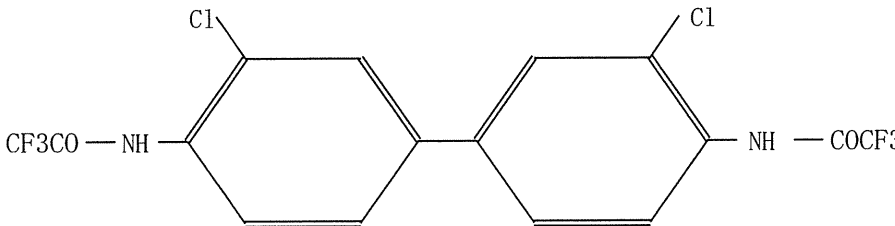
測定機関名	長野県衛生公害研究所		
住所および電話番号	長野市安茂里米村1978 電話 026-227-0354		
測定者	笹井 春雄	測定年月日	平成15年 6月24日
物質名 (英語)	3,3'-ジクロロベンジジン		
別名 (英語)			
分子式	C ₁₂ H ₁₀ Cl ₂ N ₂	分子量	253.13
CAS登録番号	プライマリリスト番号 :		
GC条件		MS条件	
機種 : HP5890 II		機種 : JMS-AX505W	
カラム液層 : HP-1		MS方式 : 磁場型	
カラム内径 : 0.32mm		イオン化方法 : EI	
カラム長さ : 30m		その他 : イオン化電圧 70eV	
カラム膜厚 : 0.25 μm			
温度条件 : 70°C (1 min) → 20°C/min → 200°C (0 min) → 7°C/min → 280°C (5 min)			
ピーク			
保持時間 : 14.9 min.			
PTRI : 2330			
備考および構造式			
			

3,3'-ジクロロベンジン

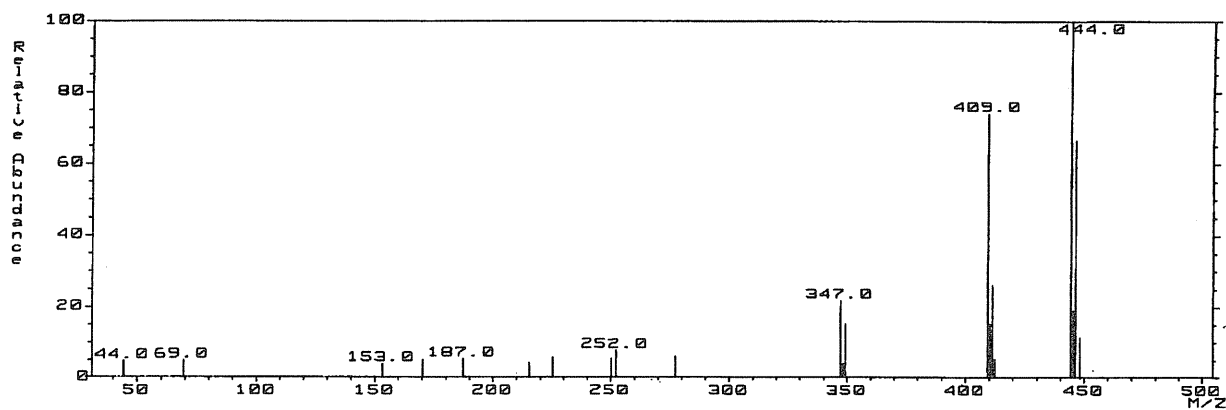


m/z	% Int.	% RIC	Intensity
77.0	4.76	1.08	37.4100
84.0	3.40	0.77	26.7243
91.0	6.42	1.46	50.4639
108.0	4.29	0.97	33.7403
126.0	11.12	2.52	87.3582
127.0	10.81	2.45	84.9412
128.0	3.50	0.79	27.4703
135.0	9.76	2.21	76.7091
153.0	3.03	0.69	23.7961
154.0	8.78	1.99	69.0217
181.0	9.23	2.09	72.5190
182.0	8.86	2.01	69.5878
190.0	4.06	0.92	31.8939
215.0	6.19	1.40	48.6512
216.0	5.70	1.29	44.7677
217.0	4.63	1.05	36.3800
251.0	7.74	1.76	60.8291
252.0	100.00	22.68	785.7353
253.0	18.12	4.11	142.3997
254.0	71.91	16.31	565.0151
255.0	12.45	2.83	97.8562
256.0	13.77	3.12	108.1651

マススペクトル付属データ

測定機関名	長野県衛生公害研究所		
住所および電話番号	長野市安茂里米村1978 電話 026-227-0354		
測定者	笹井 春雄	測定年月日	平成14年11月27日
物質名 (英語)	3,3'-ジクロロベンジジン (TFA体)		
別名 (英語)			
分子式	C ₁₆ H ₈ O ₂ F ₆ Cl ₂ N ₂	分子量	445.15
CAS登録番号	プライオリティリスト番号:		
GC条件	MS条件		
機種種: HP5890 II	機種種: JMS-AX505W		
カラム液層: HP-5	MS方式: 磁場型		
カラム内径: 0.25mm	イオン化方法: EI		
カラム長さ: 30m	その他: イオン化電圧 70eV		
カラム膜厚: 0.25 μm			
温度条件: 70°C (1 min) → 20°C/min → 200°C (0 min) → 7°C/min → 280°C (5 min)			
ピーク			
保持時間: 16.1min.			
PTRI: 2375			
備考および構造式			

3,3'-ジクロロベンジジン (TFA体)



m/z	% Int.	% RIC	Intensity
69.0	5.20	0.79	4.2984
153.0	4.21	0.64	3.4743
170.0	4.98	0.76	4.1168
187.0	5.45	0.83	4.5013
215.0	4.38	0.67	3.6162
225.0	5.50	0.84	4.5441
250.0	5.55	0.85	4.5853
252.0	7.72	1.18	6.3797
277.0	6.09	0.93	5.0277
347.0	21.61	3.29	17.8513
348.0	4.09	0.62	3.3782
349.0	15.41	2.35	12.7273
409.0	74.27	11.32	61.3433
410.0	15.29	2.33	12.6281
411.0	26.25	4.00	21.6796
412.0	5.09	0.78	4.2038
444.0	100.00	15.24	82.5928
445.0	19.33	2.95	15.9621
446.0	66.66	10.16	55.0582
448.0	11.64	1.77	9.6099