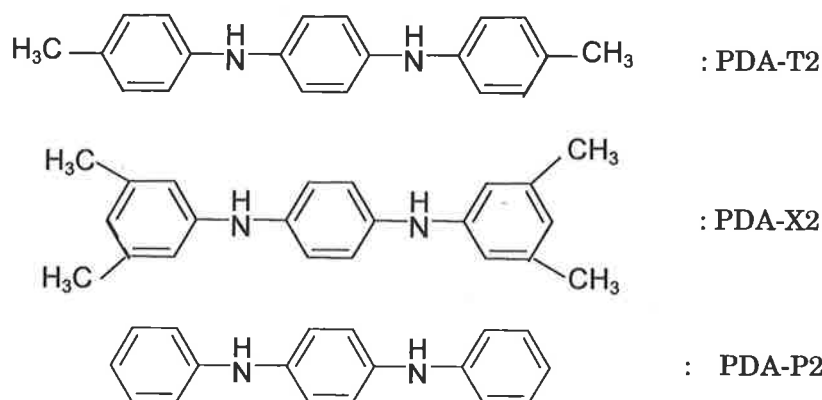


N, N' -ジトリル-パラフェニレンジアミン (PDA-T2)
 (N, N' -Ditolyl-paraphenyldiamine)
N, N' -ジキシル-パラフェニレンジアミン (PDA-X2)
 (N, N' -Dixyl-paraphenyldiamine)
N, N' -ジフェニル-パラフェニレンジアミン (PDA-P2)
 (N, N' -Diphenylparaphenyldiamine)

構造式 (注1)



物 性 (注1)

物 質	分子式	分子量	CAS.No	融点(℃)	log Pow
PDA-T2	C ₂₀ H ₂₀ N ₂	288.29	27417-40-9	183.4	3.60
PDA-X2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂	316.44	70290-05-0	232	4.41
PDA-P2	C ₁₈ H ₁₆ N ₂	260.34	74-31-7	150~151	2.79

PDA-T2 及び PDA-X2 は、平成 12 年 12 月に化審法第一種特定化学物質に指定された。
 ゴム老化防止剤 (アンテジ ST-1 など) の成分として使用されていた。

log Pow は HPLC 法により求めた。

§ 1 分 析 法

水質試料は、固相カートリッジに一定流量で通水後、ジクロロメタンで溶出する固相抽出法、もしくはヘキサンを用いた溶媒抽出法で抽出後、脱水、濃縮し、内標準物質を添加後 GC/MS で分析する。

底質試料は、1 N-KOH のエタノール水溶液でアルカリ分解をした後、抽出液を塩化ナトリウム溶液に溶解させ、ヘキサン転溶後、脱水、濃縮、フロリジルカラムでクリーンアップ後、内標準物質を添加して GC/MS で分析する。

生物試料は、アセトニトリル溶媒抽出を行い、アセトニトリル/ヘキサン分配後、アセトニトリル抽出液を塩化ナトリウム溶液に溶解させ、ヘキサン転溶後、脱水、濃縮、フロリジルカラムでクリーンアップ後、内標準物質を添加して GC/MS で分析する。

試薬・器具

【試薬】

標準物質 PDA-T2, PDA-X2：林純薬工業(株)製 (SIGMA-ALDRICH 製)

PDA-P2：和光純薬工業(株)製 化学用

内標準物質 1e, 3e, 5a - Triphenylcyclohexane - d₅

(TPCH- d₅)：林純薬工業(株)製

有機溶剤 アセトン、ジクロロメタン、ヘキサン、エタノール、アセトニトリル

：和光純薬工業(株)、関東化学製など 残留農薬・PCB 分析試験用

その他試薬 塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム

：和光純薬工業(株)製 残留農薬分析用

水酸化カリウム：和光純薬工業(株)製 試薬特級

固相カートリッジ Aquasis PLS-3JR：GL サイエンス製 (注 9)

フロリジル フロリジール PR：和光純薬工業製 (注 4)

【器具】

ターボバップ LV (または II) Zymark 製 窒素ガスを吹きつけて有機溶剤を濃縮する

Sep-Pak Concentrator System Controller Plus Waters 製 一定流量で固相カートリッジに通水する

分液ロート 1 L 容量のものを使用前にジクロロメタンで洗浄し、水質試料から対象物質の抽出に用いる

200mL 容量のものを使用前にヘキサンで洗浄し、生物抽出アセトニトリル溶液からの脂肪除去に用いる

超音波洗浄機 カイジョー製 底質、生物試料の抽出に用いる

遠心分離機 日立工機製 底質、生物試料の抽出液を分離する

カラムクロマト管 内径 1 cm、長さ約 30cm 底質、生物試料のクリーンアップに使用する

試験法

【試料の採取及び保存】

水質試料の採取時期、採水部位については「化学物質環境調査試料採取要領」のとおりに行い、ガラス瓶に密栓し冷蔵保存する。

底質試料についても水質試料同様に「化学物質環境調査試料採取要領」のとおりに行う。試料採取後はできるだけ速やかに分析する。

生物試料は採取後フードプロセッサーを用いてミンチ状にしたものを蓋付きのガラス容器に入れ密栓し、-10℃以下で保存する。試料はできるだけ速やかに分析する。

【試料の前処理】

〔水質試料〕

①固相抽出法：水質試料 500mL を 20mL/min の速度で固相カートリッジに通水する。

固相カートリッジを窒素ガスで通気乾燥後、ジクロロメタン 5mL で溶出したものを試料処理液とする。

②溶媒抽出法：水質試料 500mL に NaCl 20g を溶解後（海水を試料とするときは不要）ヘキサン 100mL を加え、10 分間振とう抽出する。静置後、ヘキサン層を分取し、再び分液ロートにヘキサン 100mL を加え、同様の操作を行う。

得られたヘキサン層をあわせ試料処理液とする。（注 2）

〔底質試料〕

底質試料 20g を 100mL の共栓付遠沈管にとり、これに 1 N 水酸化カリウムエタノール溶液 100mL を加え 80℃で 2 時間アルカリ分解を行った後（注 3）、3000rpm で 10 分間遠心分離し上澄液を回収する。残さにエタノール 30mL を加え、10 分間超音波処理、10 分間振とう処理後、10 分間遠心分離し上澄液を回収する。残さを再度、超音波処理・振とう・遠心分離する。

4 % 塩化ナトリウム水溶液 500mL を入れた 1 L 分液ロートに、先に得られた上澄液（底質試料のアルカリ分解溶液及びエタノール溶液）をあわせて、加え十分混合した後、ヘキサン 100mL を加え、10 分間振とう抽出する。

静置後、ヘキサン層を分取し、再び分液ロートにヘキサン 100mL を加え同様の操作を行う。得られたヘキサン層をあわせ試料処理液とする。

〔生物試料〕

生物試料 20g を 100mL の共栓付遠沈管にとり、アセトニトリル 50mL を加え、10 分間超音波処理、10 分間振とうした後、3000rpm で 10 分間遠心分離し上澄液を回収する。残さにアセトニトリル 50mL を加え、再度同様の抽出分離操作を行う。

得られたアセトニトリル層をあわせて 200mL 分液ロートに入れ、ヘキサン 20mL を加え軽く振とうし、アセトニトリル層から脂質分を除去する

4 % 塩化ナトリウム水溶液 500mL を入れた 1 L 分液ロートに、先のアセトニトリル層を加え十分混合した後、ヘキサン 100mL を加え、10 分間振とう抽出する。

静置後、ヘキサン層を分取し、再び分液ロートにヘキサン 100mL を加え同様の操作を行う。得られたヘキサン層をあわせ試料処理液とする。

【試料溶液の調製】

〔水質試料〕

試料処理液に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、窒素気流下で 1mL にまで濃縮する。得られた濃縮液に内標準物質として TPCH- d_5 を 0.1 μ g 添加し、GC/MS で分析を行う。

〔底質及び生物試料〕

試料処理液に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、窒素気流下で 1mL にまで濃縮する。得られた濃縮液を予め用意しておいたフロリジルカラム（注 4） 4 g に負荷し液面をカラムヘッドまで下げる。少量のヘキサンで抽出液の容器を洗い、洗液をフロリジルカラムに負荷後、ヘキサン 10mL 及び 1 %アセトン／ヘキサン 40mL を流し洗浄する。その後、5 %アセトン／ヘキサンを 40mL 流し、この溶出液を窒素気流下で 1mL にまで濃縮する。得られた濃縮液に内標準物質として TPCH- d₅ を 0.1 μg 添加し、GC/MS で分析を行う。

【空試料液の調製】

試料と同量の精製水を用い、試料の前処理及び試料溶液の調製の項に従って得られた試料液を空試料液とする。

【標準溶液の調製】

標準試薬を各々アセトンに溶解し 1mg/mL の標準原液を調製する。

この標準原液を適宜ジクロロメタンもしくはヘキサンで希釈し、濃度 0.005～0.2 μg/mL の検量線作成用標準溶液とする。各濃度の標準溶液には、内標準物質として TPCH- d₅ を 0.1 μg/mL の濃度になるよう添加する。また対象物質の一部が酸化される可能性があるため、標準溶液は要事調製が望ましい。

【測定条件】

GC/MS 測定条件

- ・ 使用機種 GC ; HP5890 II、MS ; JMS-AM II 150（注 5）
- ・ 使用カラム Agilent Ultra-2（長さ 25m 内径 0.2mm 膜厚 0.33 μm）（注 6）
- ・ カラム温度 50 °C (1min) → 30 °C / min → 250 °C → 5 °C / min → 280 °C → 30 °C / min
→ 300 °C (5min)
- ・ 注入口温度 200 °C
- ・ 注入量 2 μL
- ・ インターフェース温度 250 °C
- ・ キャリアガス He（流量 1mL/min）
- ・ 注入方法 スプリットレス（パージタイム 1.5min）
- ・ イオン源温度 230 °C
- ・ イオン化電流 300 μA
- ・ モニターイオン

	定量用	確認用
PDA-P2	260	183
PDA-T2	288	180
PDA-X2	316	315
IS : 1e,3e,5a - Triphenylcyclohexane - d ₅ (TPCH- d ₅)	317	318

【検量線】

検量線作成用標準溶液 1 mL に内標準溶液 0.1 μg を添加し、その 2 μL を GC/MS に注入する。IS : TPCH- d_5 に対する各物質のピーク面積比から検量線を作成する。

【定量】

試料溶液 2 μL を GC/MS に注入し、各物質のピーク面積と IS : TPCH- d_5 のピーク面積比から検量線により定量値を求める。

【計算】

計算値 ($\mu\text{g/mL}$ 、 g) = 検出量 (μg) / 試料量 (mL 、 g)

【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 7)

物 質	I D L (ng/mL)	濃縮率 (倍)	I D L 濃度 (ng/L)
PDA-P2	0.25	500	0.50
PDA-T2	0.30	500	0.60
PDA-X2	0.77	500	1.5

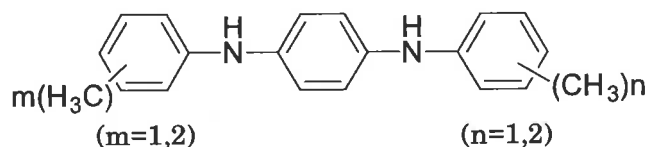
【検出下限及び定量下限】

本分析法に基づく水質の検出下限及び定量下限を下記に示す。(注 8)

	水質 ($\mu\text{g/L}$)		底質 ($\mu\text{g/kg}$)	生物 ($\mu\text{g/kg}$)
	検出下限	定量下限	検出下限	検出下限
PDA-P2	0.006	0.020	0.39	1.7
PDA-T2	0.009	0.029	0.41	1.3
PDA-X2	0.020	0.065	0.37	1.0

注 解

- (注1) 化審法第一種特定化学物質に指定されている名称は、N-モノ(ジ)メチルフェニル-N'-モノ(ジ)メチルフェニル-パラフェニレンジアミンである。構造式及び物性は、上記物質のうち実際の分析に使用した PDA-T2:N,N'-ジ-(4-トリル)-パラフェニレンジアミン N,N'-Di-(4-tolyl)-paraphenylendiamine) と PDA-X2:N,N'-ジ-(3,5-キシリル)-パラフェニレンジアミン (N,N'-Di-(3,5-xylyl)-paraphenylendiamine) を示している。表題中の名称は総称であり、下記の構造式中の CH₃ の数や位置により名称は異なる。

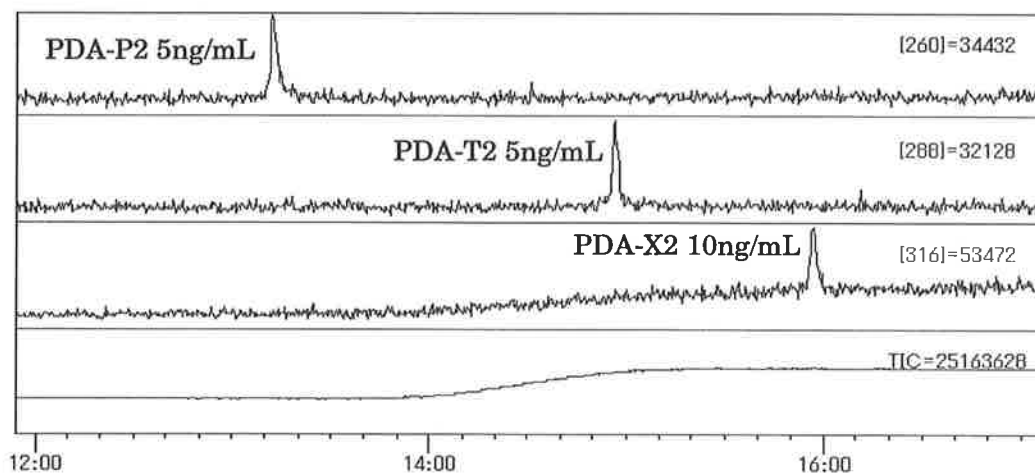


- (注2) 水質の状況によっては、エマルジョンが生じることがある。エマルジョンが生じるとヘキサン層との分離が困難になるため、分液ロートを振とうする際には最初に軽く振ってエマルジョンが生じないことを確認してから行う。当センターで用いた水質試料では、河川水でエマルジョンが生じたので1回目の振とうは軽く振り、2回目から振とう機を用いた。
- (注3) 本報告では、80℃で1時間アルカリ分解を行った結果を掲載しているが、室温で一晩放置後でも同様の回収率が得られた。
- (注4) 130℃で一晩活性化し、デシケータ内で放冷後使用する。ヘキササンでガラスカラムに充填した後、水分を除去するため表層部に無水硫酸ナトリウムを約2 g 充填した。溶出パターンを解説4. クリーンアップの図に示す。5%アセトン/ヘキサン 20mL 流量で、全ての対象物質が回収された。
- (注5) 本法では四重極の MS で分析を行いピークが検出されたが、一部磁場型の MS を用いた際に、感度が悪く、添加回収試験においてバラツキが大きかったとの報告があった。使用した磁場型 MS 及び測定条件は以下2通りであった。
 (条件1) MS: JEOL DX303 カラム: DB-5MS (30m×0.25mmi. d. ×0.25 μm)
 昇温条件: 40 °C (1min) → 30 °C/min → 250 °C → 5 °C/min → 280 °C → 30 °C/min → 300 °C (5min) キャリアガス: He 1mL/min スプリットレス
 注入口温度: 200°C イオン源温度: 230°C インターフェース温度: 250°C
 イオン加速電圧: 70eV (EI) イオン化電流: 300 μA 検出モード: SIM
 (条件2) MS: JEOL DX505W カラム: DB-5MS (30m×0.32mmi. d. ×0.25 μm) または Ultra-2 (25m×0.32mmi. d. ×0.52 μm)
 昇温条件: 70 °C (1min) → 25 °C/min → 260 °C → 5 °C/min → 280 °C → 30 °C/min → 300 °C (5min) キャリアガス: He 35kPa スプリットレス
 注入口温度: 200°C または 230°C イオン源温度: 230°C
 インターフェース温度: 250°C
- (注6) 一部サンプルの分析には、supelco 社 eQuity 1 または 5 カラムを用いた。ピーク形状など特に問題はなかった。

(注7) 装置検出限界 (IDL) は、「環境調査における検出限界の算出について」(平成11年5月) に従い下記のとおり算出した。

物質名	PDA-P2	PDA-T2	PDA-X2
注入液濃度 (ng/mL)	5	5	10
測定1	5.3	4.8	6.9
測定2	5.1	4.9	6.9
測定3	5.4	4.7	7.0
測定4	5.1	5.1	6.9
測定5	5.2	4.6	7.2
測定6	5.3	4.9	6.9
測定7	5.3	4.7	8.0
標準偏差	0.13	0.15	0.40
IDL(ng/mL)	0.25	0.30	0.77
IDL試料濃度 換算値(ng/L)	0.49	0.60	1.55
S/N	12	10	10
S/N適否	○	○	○
平均値(ng)	5.2	4.8	7.1
CV(%)	2.4	3.2	5.6

注入濃度: 5, 10ng/mL, 装置注入量: 2 μ L, $t(7, 0.05) = 1.943$
 最終液量: 1mL, 試料量: 500mL



(注 8) 検出限界及び定量限界は「検出限界及び定量限界の算定方法」(昭和 62 年 3 月)により、次の通り算出した。

PDA-P2

水質				底質		生物
試料濃度(ug/L)	0.04	0.08	0.16	検出限界推定値(ug/kg)	0.50	0.15
応答値(X)	0.041	0.085	0.17	試料濃度(ug/kg)	2.5 (wet)	10
標準偏差(δ R)	0.0023	0.0020	0.0042	分析値(ug/kg)	1.46	7.7
検出力(Dn)	0.00165	0.00138	0.00297	標準偏差(δ R)	0.123	0.552
		0.00200		検出限界(DL)	0.387	1.735
検出限界(D3)		0.00600		95%信頼区間	0.247 — 0.850	1.110 — 3.817
定量限界(D10)		0.01999				
不偏分散(Fd)						

PDA-T2

水質				底質		生物
試料濃度(ug/L)	0.04	0.08	0.16	検出限界推定値(ug/kg)	0.73	0.22
応答値(X)	0.035	0.074	0.161	試料濃度(ug/kg)	2.5 (wet)	10
標準偏差(δ R)	0.0022	0.0036	0.0056	分析値(ug/kg)	1.62	4.80
検出力(Dn)	0.00187	0.00286	0.00408	標準偏差(δ R)	0.130	0.416
		0.00294		検出限界(DL)	0.409	1.307
検出限界(D3)		0.00881		95%信頼区間	0.261 — 0.899	0.837 — 2.876
定量限界(D10)		0.02935				
不偏分散(Fd)						

PDA-X2

水質			底質		生物	
試料濃度(ug/L)	0.08	0.16	0.32	検出限界推定値(ug/kg)	1.6	0.49
応答値(X)	0.069	0.153	0.352	試料濃度(ug/kg)	5 (wet)	20
標準偏差(δ R)	0.0063	0.0063	0.0140	分析値(ug/kg)	2.37	6.8
検出力(Dn)	0.00540	0.00484	0.00935	標準偏差(δ R)	0.119	0.324
		0.00653		検出限界(DL)	0.374	1.018
検出限界(D3)		0.01959		95%信頼区間	0.239 — 0.823	0.652 — 2.240
定量限界(D10)		0.06529				
不偏分散(Fd)						

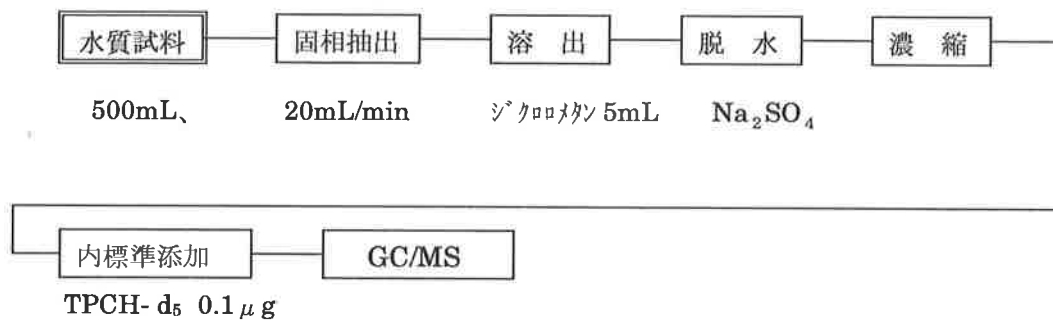
(注 9) 固相カートリッジは使用前にジクロロメタン、メタノール、精製水の順でコンディショニングを行っておく。本試験で使用したカートリッジのほか、PS-2: Waters 製の充填剤が SDV 等で対象物質の測定を妨害しないカートリッジであれば使用できる。

§ 2 解 説

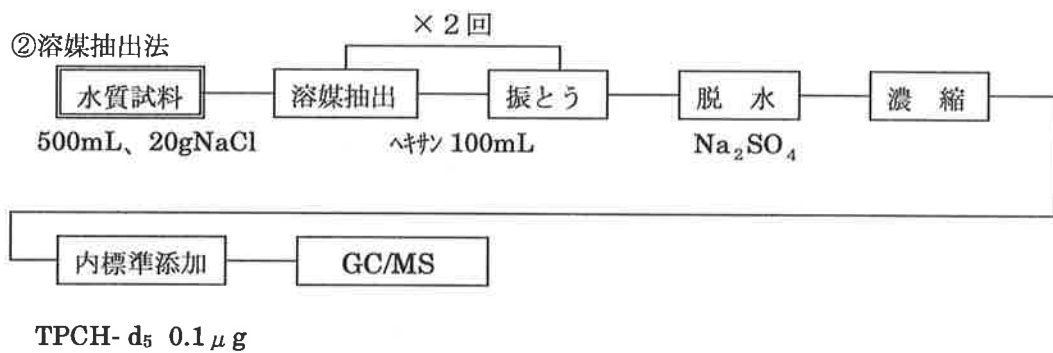
【分析法フローチャート】

[水質試料]

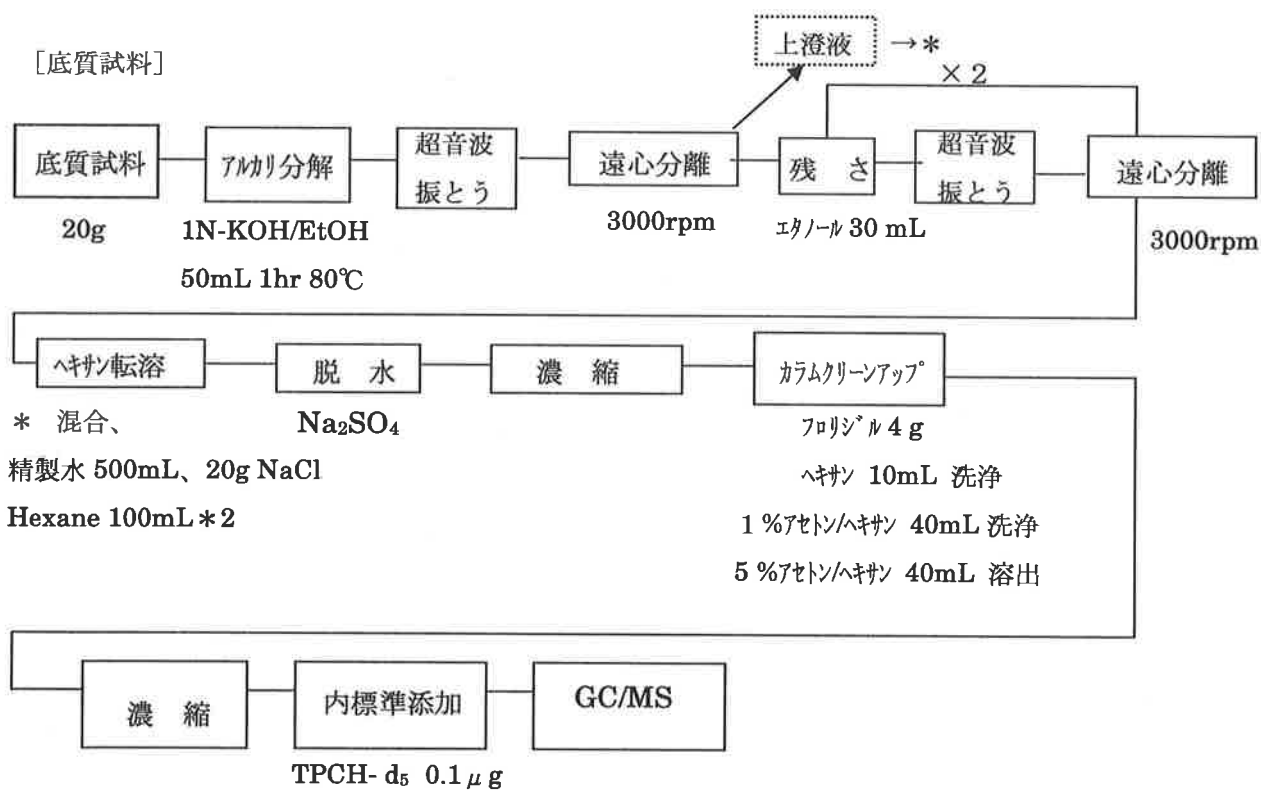
①固相抽出法



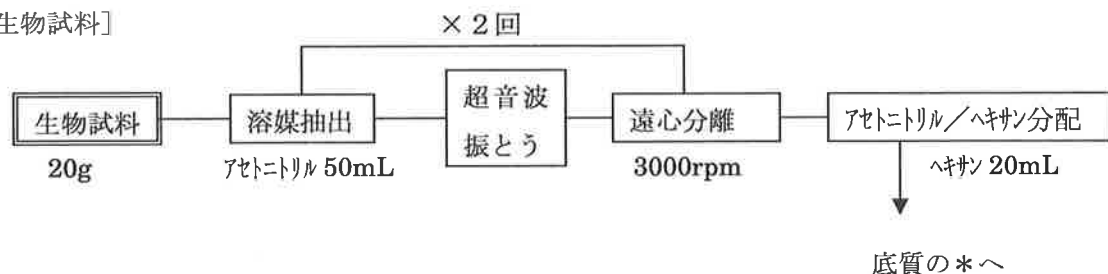
②溶媒抽出法



[底質試料]

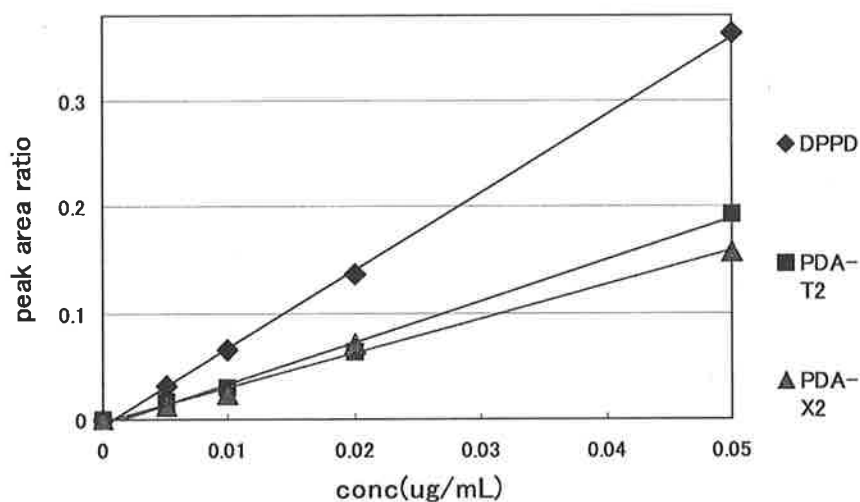


[生物試料]



[分析法の検討]

1. 検量線 下記に検量線の一例を示す。(IS 濃度; $0.1 \mu\text{g/mL}$)



2. 低濃度添加回収試験

	試料	精製水	河川水	海水	底質	生物
	試料量 (mL)	500	500	500	20g	20g
添加量 (μg)	PDA-P2	0.04	0.04	0.04	0.05	0.20
	PDA-T2	0.04	0.04	0.04	0.05	0.20
	PDA-X2	0.08	0.08	0.08	0.10	0.40
	測定回数	7	7	7	4	4
	回収率 (%)	() 内は変動係数%				
	PDA-P2	90 (4.8)	115 (6.9)	100 (5.8)	58 (8.5)	77 (7.1)
	PDA-T2	105 (9.7)	118 (7.8)	101 (5.5)	64 (7.6)	48 (8.7)
	PDA-X2	103 (8.2)	119 (9.7)	100 (5.8)	46 (5.6)	36 (9.5)

水質における回収率は、溶媒抽出法での結果である。

固相抽出法を用いた添加回収試験において、海水に添加した PDA-X2 の回収率が低い傾向にあった。

3. 分解性スクリーニング試験

精製水 500mL を各 pH に調整した後、標準物質を添加し、本分析法に従い回収実験を行った。

実験結果を下表に示す。試料の抽出は溶媒抽出法で行った。

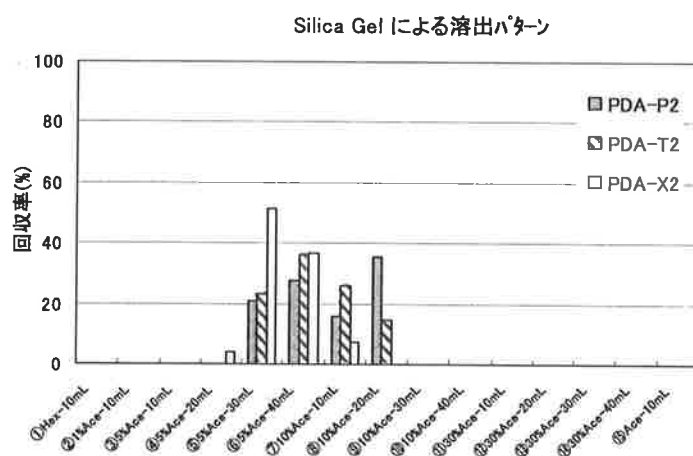
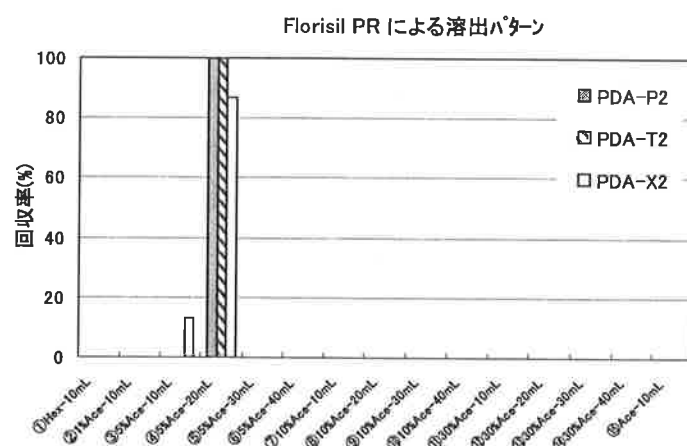
対象物質の残存率が、pH 5 において低い結果となった。

物質	初期濃度 ($\mu\text{g/L}$)	1時間後(%)			5日後(明所)(%)			5日後(暗所)(%)		
		pH5	pH7	pH9	pH5	pH7	pH9	pH5	pH7	pH9
PDA-P2	0.2	100	106	105	10	98	76	33	93	82
PDA-T2	0.2	85	109	100	11	98	95	18	95	100
PDA-X2	0.2	88	110	100	14	87	84	32	85	97

4. クリーンアップ

底質及び試料からの抽出液のクリーンアップのため、フロリジル及びシリカゲルカラムで対象物質の回収率を求めた。

対象物質は、フロリジルカラムにおいて5%アセトン含有ヘキサン20 mL でほぼ回収されたのに対し、シリカゲルカラムにおいては5%アセトン含有ヘキサン20 mL~10%アセトン含有ヘキサン30 mL にかけて徐々に溶出した。



5. 対象物質のマスマスペクトル

図1に各物質のマスマスペクトルを示す。

6. 標準溶液のマスクロマトグラム

図2に標準物質のマスクロマトグラムを示す。

7. 分析例のマスキロマトグラム

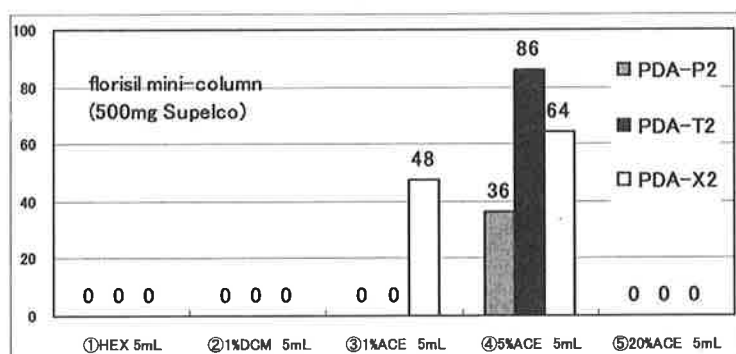
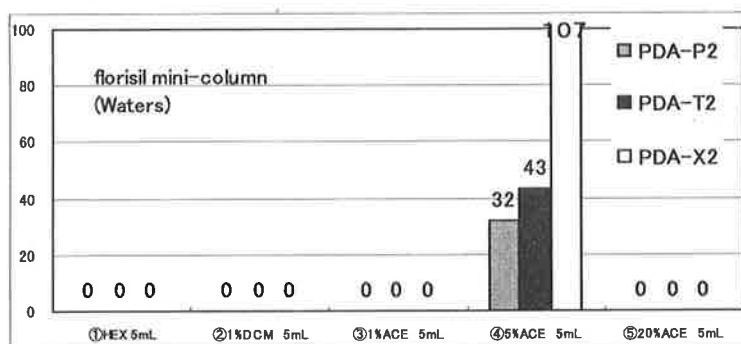
図3（－1，2）に河川水への対象物質の無添加及び添加試料を、図4（－1，2）に海水への対象物質の無添加及び添加試料を、図5（－1，2）に底質への対象物質の無添加及び添加試料を、図6（－1，2）に生物への対象物質の無添加及び添加試料のマスキロマトグラムを示す。

8. フロリジルクリーンアップのマスキロマトグラム及びマススペクトル

フロリジルカラムに対象物質3種の混合ヘキサン溶液(PDA-P2;2, PDA-T2;2, PDA-X2; 4 μ g/mL)を負荷し、底質及び生物試料のクリーンアップと同様の操作を行ったところ、回収率が100%にならない現象が生じた。図7に 5%Ace/Hex50mL 溶出液のマスキロマトグラムを示す。マスキロマトグラムの対象物質のピーク形状が崩れている状況が確認された。(PDA-P2, PDA-T2, PDA-X2の↓で示すピーク)

くわえて、標準物質のマスキロマトグラムには見られなかった新たなピーク(①②③↓に示す)が確認された。これらのピークは本来の対象物質の保持時間の1.5～2分程度前に現れマススペクトルが対象物質と類似していた。各ピークのマススペクトルを図8に示す。

こうした現象が、対象物質とフロリジルとの接触時間の差により変化するのを確認するため、溶出スピードを調節し接触時間による変動をみた。従来のように溶出スピードを調整せず、オープンカラムのコックを全開にして同様の溶出を行ったが、溶出スピードを1秒あたり約1滴とした先のピークと同じような形状の乱れ及び保持時間の異なるピークの出現が見られた。また、フロリジル充填量の少ない市販フロリジルカートリッジ(waters、supelco社製の500mg充填)でも試みたが、状況は改善されず同様の結果となった。



以上のことから、対象物質のピーク形状の乱れ及び新たなピークの出現に関し、対象物質とフ

ロリジルとの接触時間やフロリジルの充填量による差違はみられなかった。

上記の現象が単独の対象物質においても生ずるのか確認するため、それぞれの対象物質を単独で PDA-P2 ; 1 , PDA-T2 ; 1 , PDA-X2 ; 2 $\mu\text{g/mL}$ を負荷し、底質及び生物試料のクリーンアップと同様の操作を行ったところ、PDA-P2 においては前述の 3 種混合溶液と同様に回収率が 100%にならない現象が生じた。図 9 に 5%Ace/Hex50mL 溶出液のマスキロマトグラムを示す。また保持時間の 2 分程度前に、先と同じく対象物質と類似のマススペクトル①が現れた。このマススペクトルを図 9 に示す。

ほか PDA-T2 及び PDA-X2 においては、100%の回収率が得られピーク形状の崩れも見られなかった。

前述の現象が生ずる原因が、対象物質とフロリジルカラムとの接触によるのか否か、確認するため以下の試験を実施した。フロリジルカラムに対象物質を負荷しない状態で、従来の底質及び生物試料のクリーンアップと同様の操作を行い得られた 5%Ace/Hex 溶液(blank-5%Ace/Hex と示す)をそのまま GC/MS で測定、この blank-5%Ace/Hex に対象物質 (PDA-P2 ; 0.6 μg , PDA-T2 ; 0.6, PDA-X2 ; 1.2 $\mu\text{g/mL}$) を添加後 GC/MS で測定し、各物質のピーク形状を確認した。

その結果、blank-5%Ace/Hex では対象物質及び類似マススペクトルを持ついずれのピークも検出されなかった。チャートを図 10 (2) に示す。

一方、blank-5%Ace/Hex に対象物質を添加したサンプルでは PDA-P2 のピーク形状が乱れ、その保持時間の約 2 分前に類似マススペクトルを持つピークが検出された。チャートを図 10 (3) に示す。ピーク形状は、図 10 (1) に示す blank-5%Ace/Hex を含有しない標準物質とは異なっており、本物質が直接フロリジルカラムとの接触を持たなくともフロリジルカラムとの接触を持った 5%Ace/Hex との共存下において、性状が不安定になることが示された。

【評価】

本法により、環境水質中で $\mu\text{g/L}$ 、底質及び生物試料では $\mu\text{g/kg}$ レベルで存在する PDA-T2、PDA-X2 及び PDA-P2 の定量分析が可能である。

実サンプルの測定では、河川水、海水、底質及び生物で、上記 3 物質は検出されなかった。

水質試料においては、良好な回収率が得られ環境試料への適用が可能であると考ええる。

しかしながら底質及び生物試料で用いるフロリジルクリーンアップにおいて、対象物質のピーク形状が悪くなり、定量に影響を及ぼす現象が生ずることがある。そのため底質及び生物試料における安定した分析法の確立には至っていないと考える。

【参考文献】

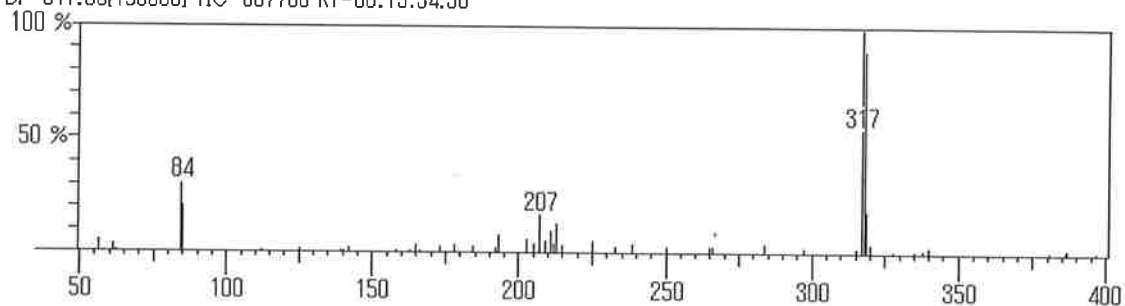
- 1) 昭和 53 年度 化学物質環境調査分析方法報告書；(財) 日本環境協会
- 2) 昭和 54、55 年度 化学物質分析法開発調査報告書；(財) 日本環境協会
- 3) 衛生試験法 注解；1227,1229(1980)
- 4) 化学物質と環境 平成 14 年度 化学物質分析法開発調査報告書；
環境省 環境保健部 環境安全課(2003)

【担当者氏名】

兵庫県立健康環境科学研究所 センター 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3 丁目 1-27
吉田光方子、藤森一男、中野武
TEL : 078-735-6918、FAX : 078-735-7817

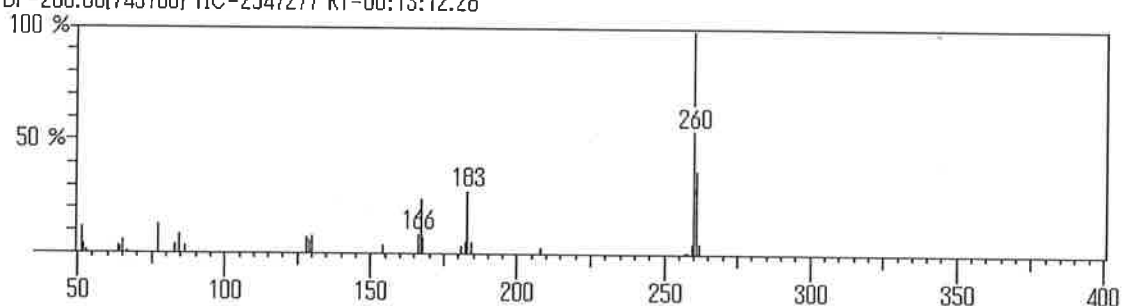
IS ; 1e,3e,5a-triphenylcyclohexane-d₅ (TPCH-d₅)

BP=317.00[153600] TIC=667700 RT=00:13:34.30



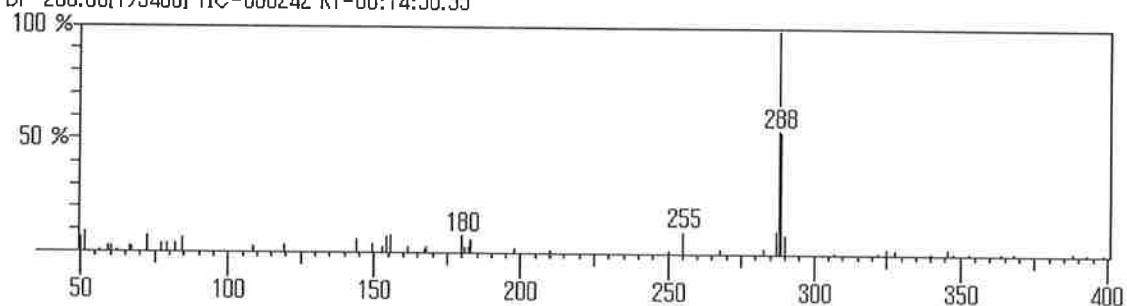
N, N'- Diphenyl - p - Phenylenediamine (PDA-P2)

BP=260.00[743168] TIC=2547277 RT=00:13:12.26



N, N' - Di - (4-tolyl) - p - Phenylenediamine (PDA-T2)

BP=288.00[193408] TIC=680242 RT=00:14:56.55



N, N' - Di - (3,5-xylyl) - p - Phenylenediamine (PDA-X2)

BP=316.00[379584] TIC=1459248 RT=00:15:57.55

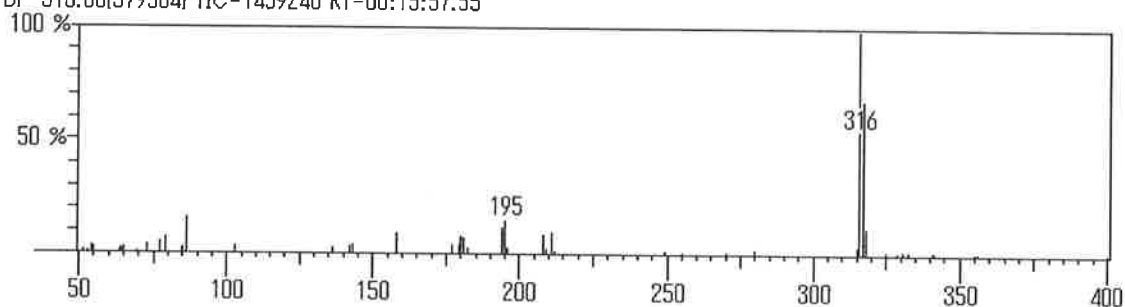


図1：標準物質のマススペクトル

Standard MS クロマトグラム

(PDA-P2 ; 0.1 , PDA-T2 ; 0.1 , PDA-X2 ; 0.1 μ g/mL) (IS ; TPCH-d₅ ; 0.1 μ g/mL)

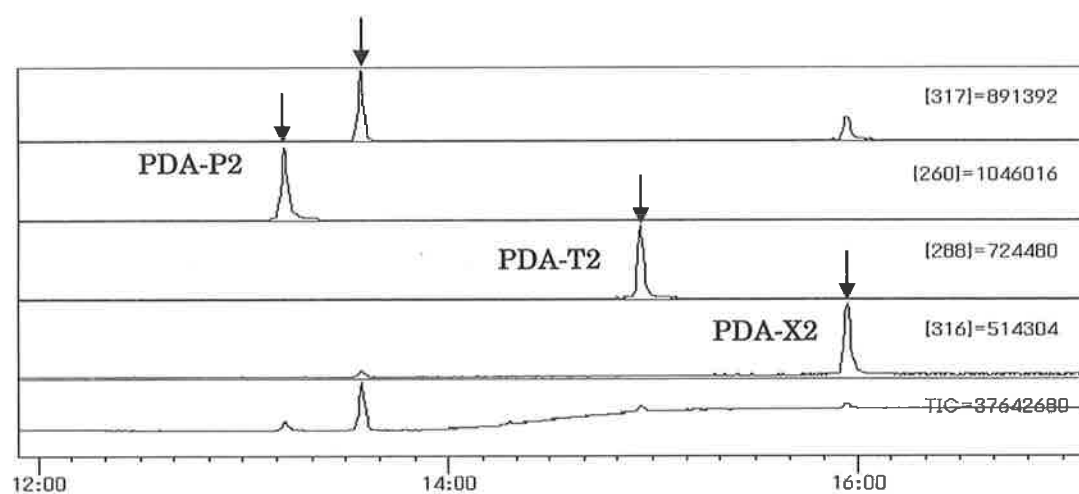


図 2 : 標準物質のマスキロマトグラム

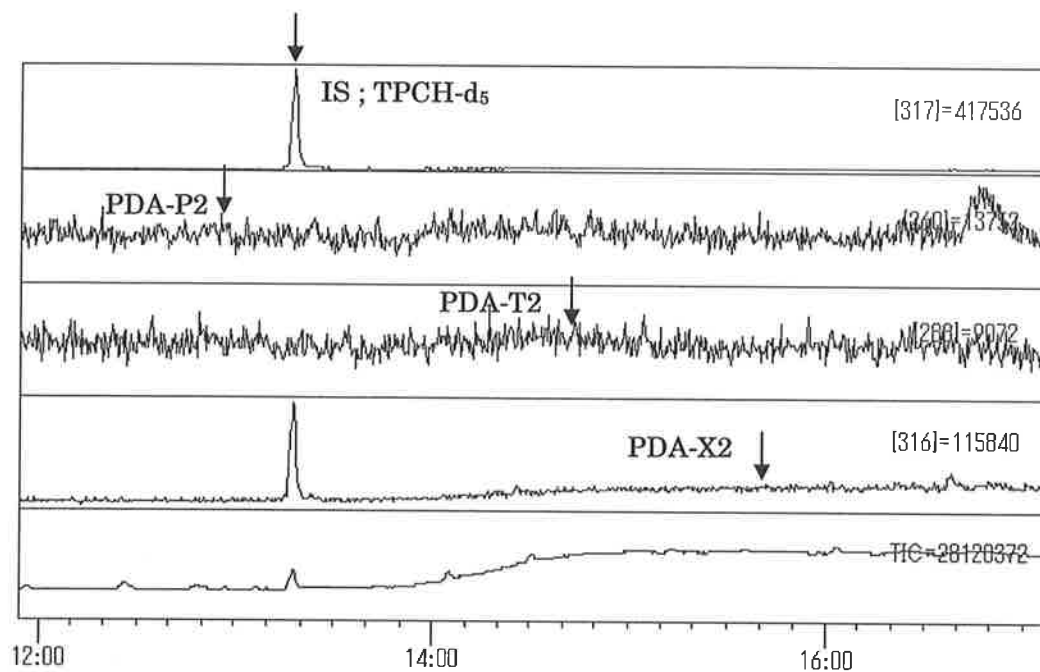


図 3 - 1 : 河川水のマスキロマトグラム (無添加)

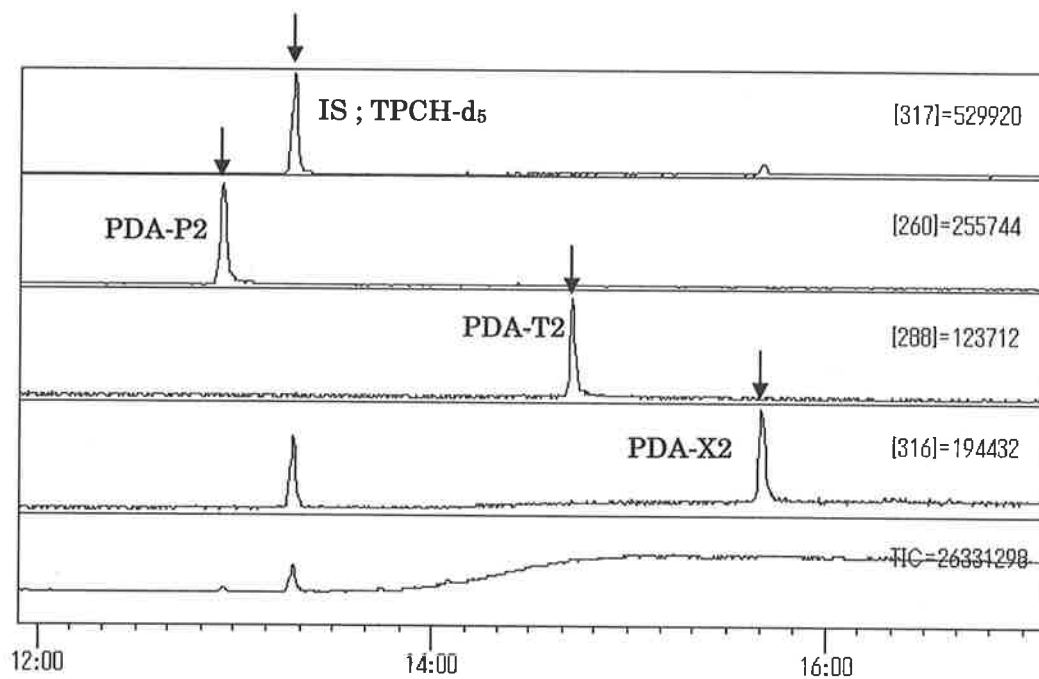


図 3 - 2 : 河川水のマスキロマトグラム (添加)
(PDA-P2 ; 40 , PDA-T2 ; 40 , PDA-X2 ; 80 ng/mL)

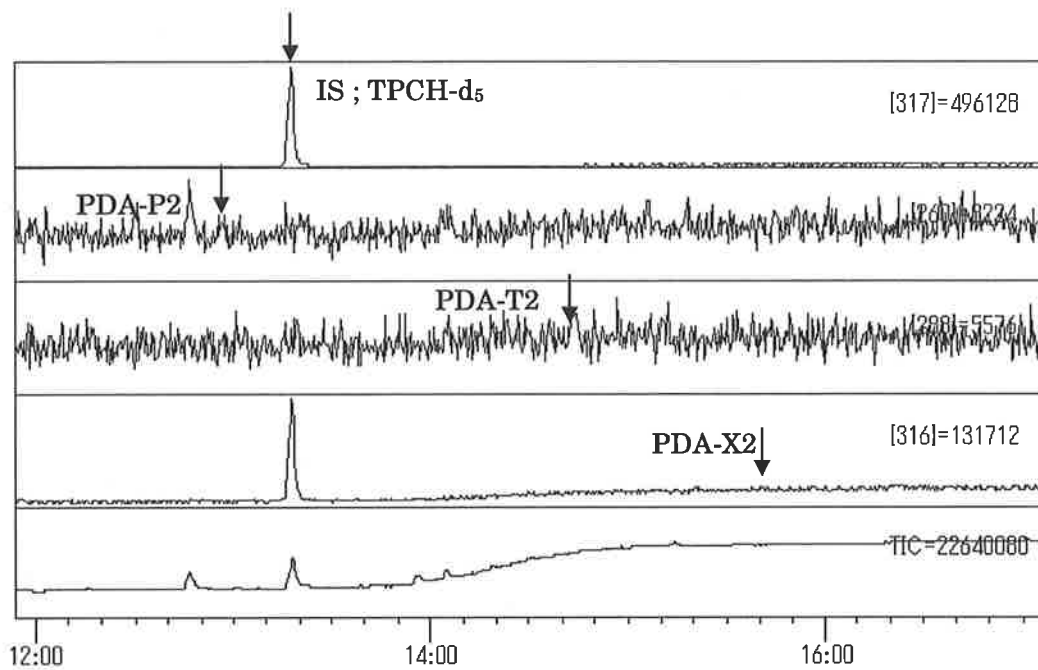


図 4 - 1 : 海水のマスキロマトグラム (無添加)

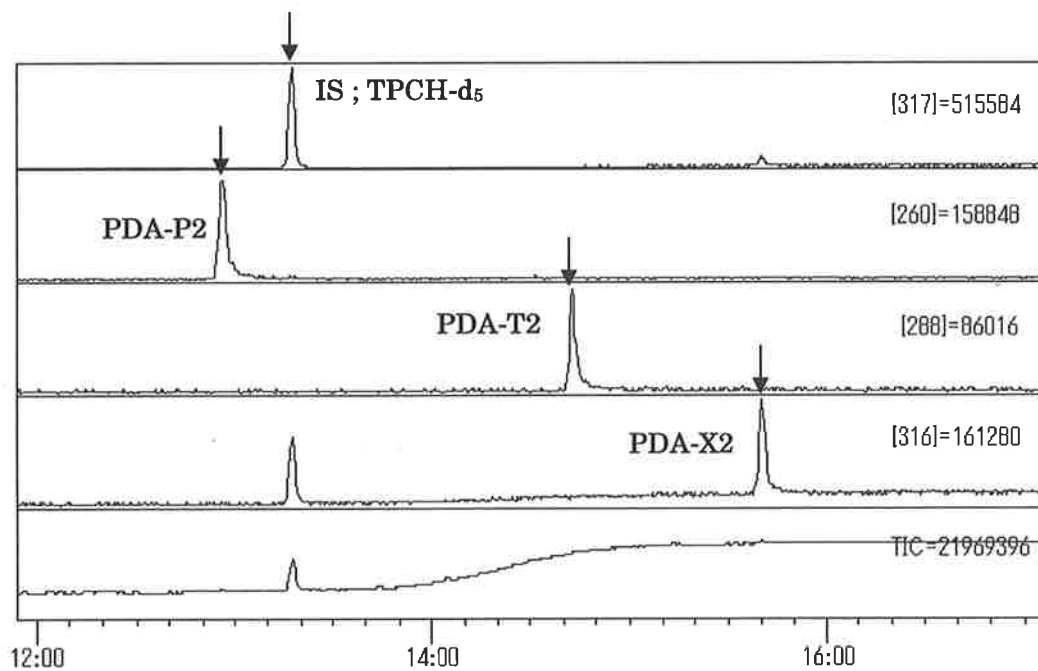


図 4 - 2 : 海水のマスキロマトグラム (添加)
(PDA-P2 ; 40 , PDA-T2 ; 40 , PDA-X2 ; 80 ng/mL)

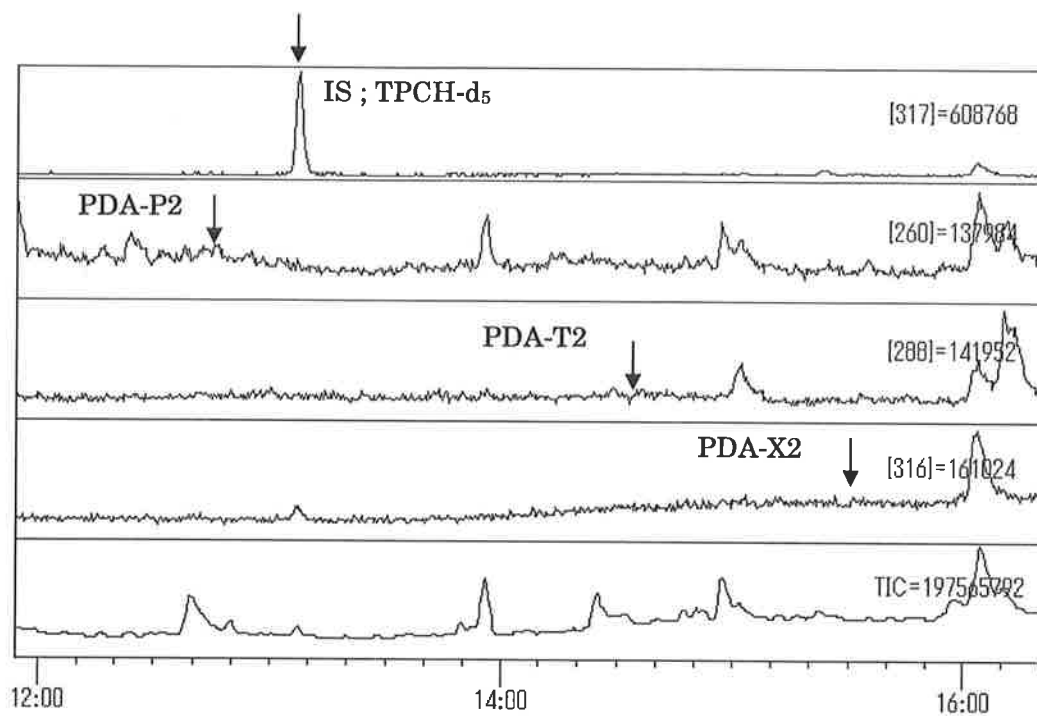


図 5 - 1 : 底質のマスキロマトグラム (無添加)

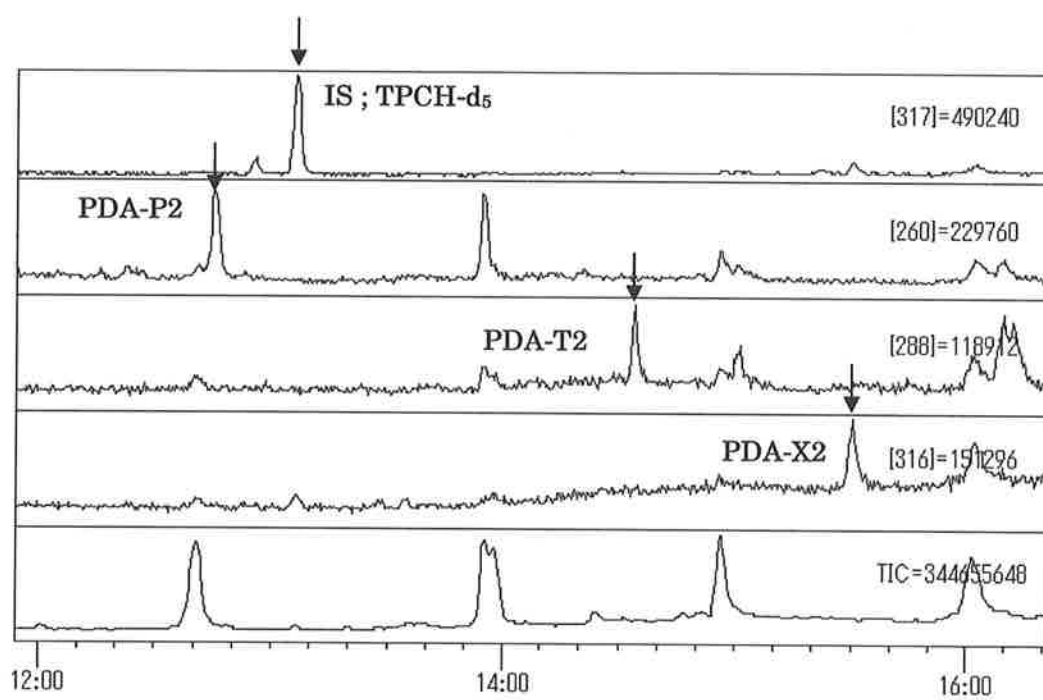


図 5 - 2 : 底質のマスキロマトグラム (添加)
(PDA-P2 ; 50 , PDA-T2 ; 50 , PDA-X2 ; 100 ng/mL)

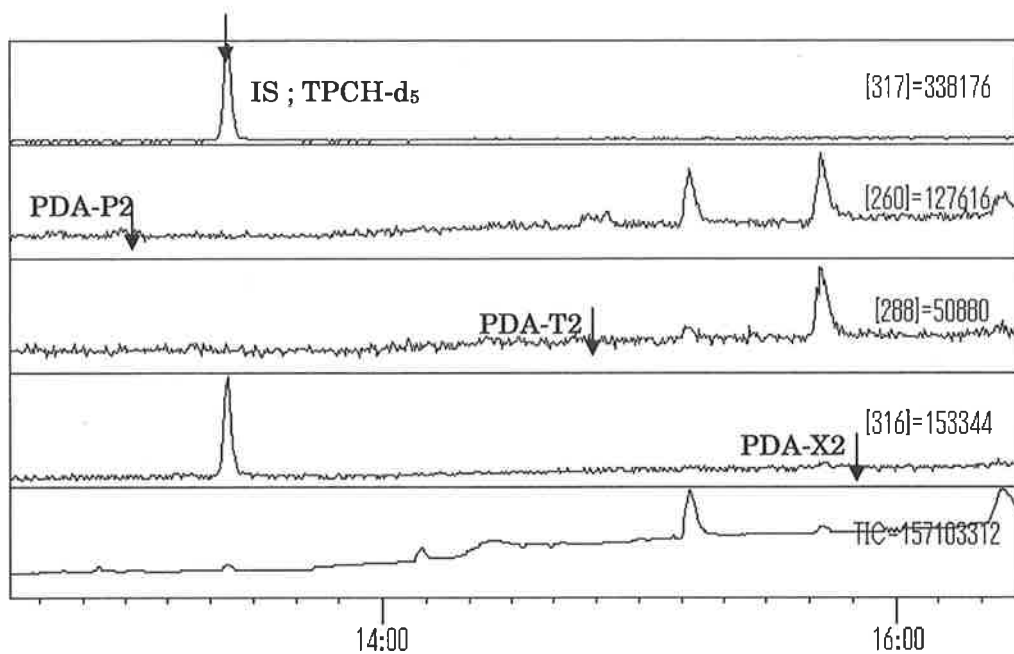


図 6 - 1 : 生物のマスクロマトグラム (無添加)

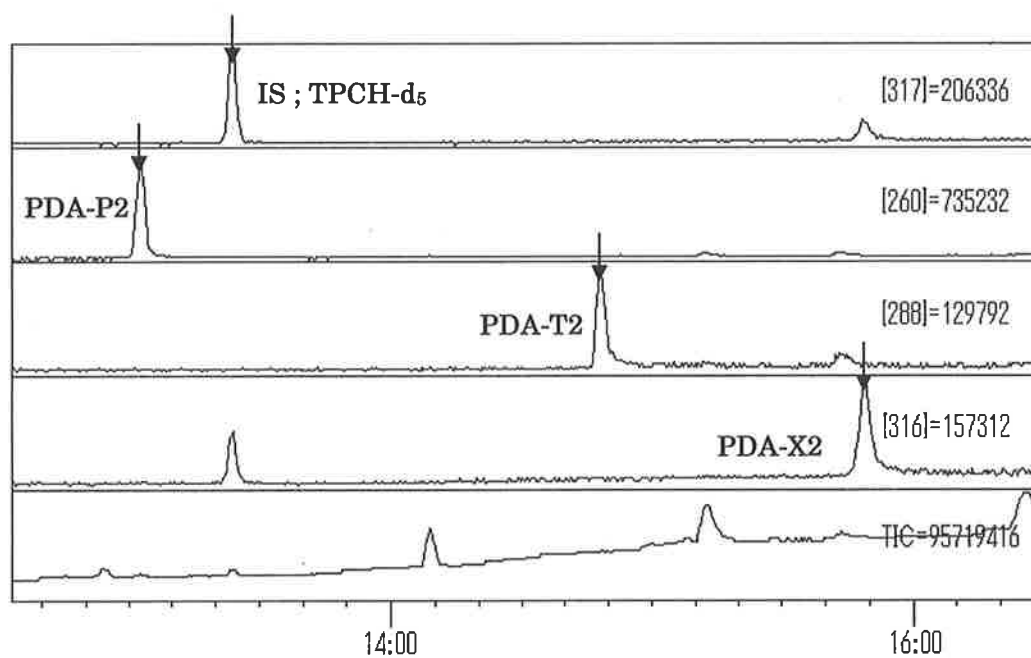


図 6 - 2 : 生物のマスクロマトグラム (添加)
(PDA-P2 ; 200 , PDA-T2 ; 200 , PDA-X2 ; 400 ng/mL)

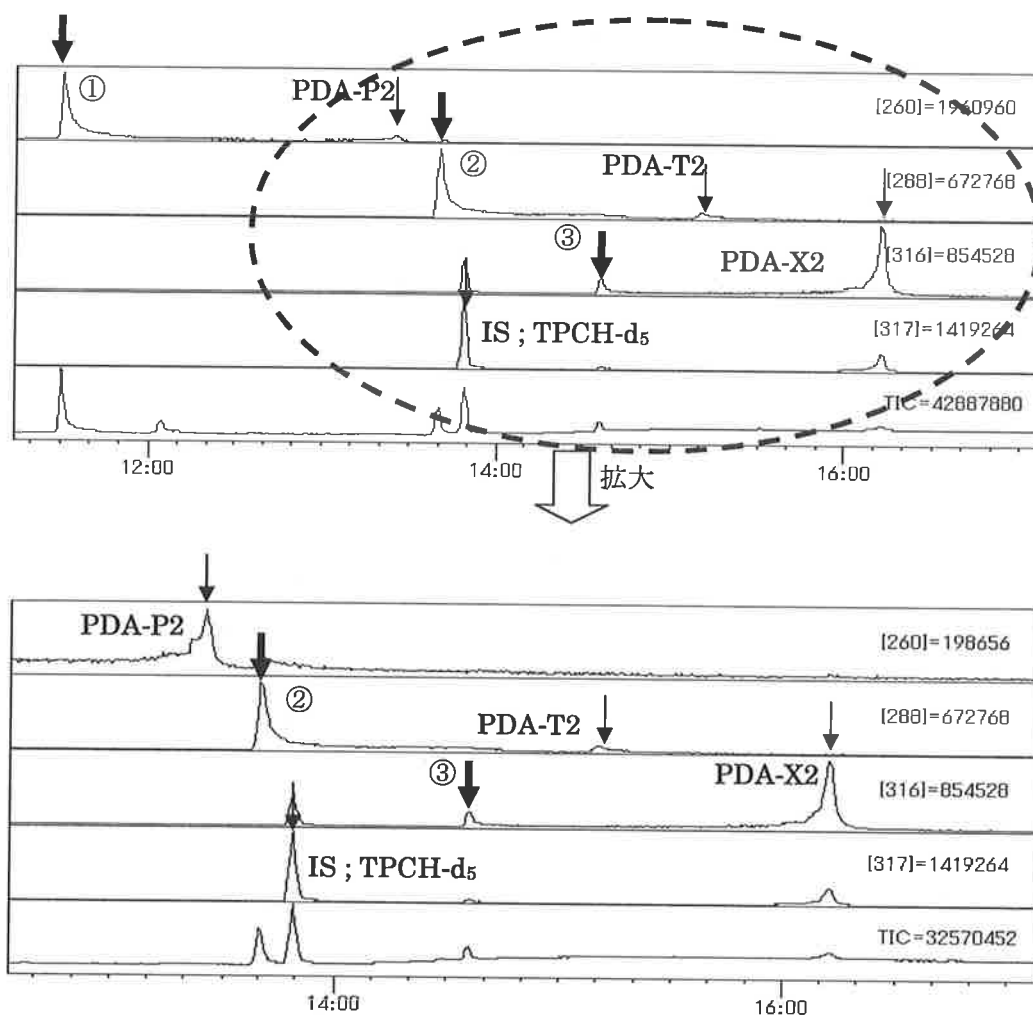


図 7：対象物質 3 種の混合ヘキサン溶液フロリジルクリーンアップのマスククロマトグラム

(PDA-P2 ; 2 , PDA-T2 ; 2 , PDA-X2 ; 4 μ g/mL 添加)

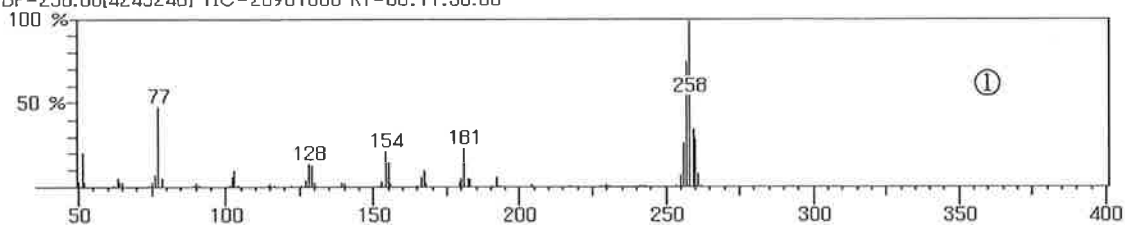
speed control(+)有 (1drop/sec) 5%Ace/Hex50mL 溶出 open-column Florisil 5g

フロリジルカラムに対象物質のヘキサン溶液(PDA-P2 ; 2 , PDA-T2 ; 2 , PDA-X2 ; 4 μ g/mL)を負荷し、底質及び生物試料のクリーンアップと同様の操作を行ったところ、回収率が 100%にならない現象が生じた。

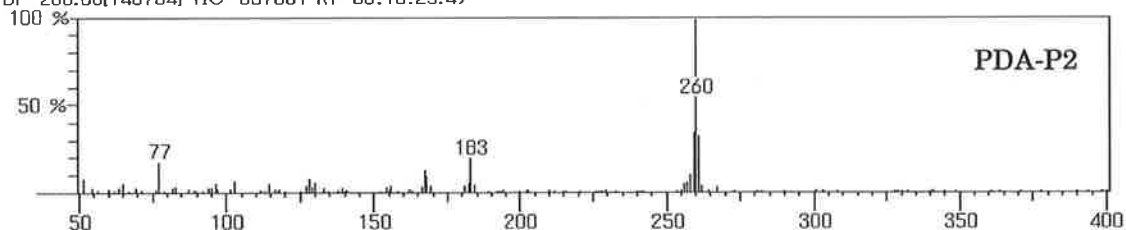
マスククロマトグラムの対象物質のピーク形状が崩れている状況が確認された。(PDA-P2, PDA-T2 , PDA-X2 の↓で示すピーク)

くわえて、標準物質のマスククロマトグラムには見られなかった①②③↓に示す新たなピークが確認された。これらのピークは本来の対象物質の保持時間の 1.5～2 分程度前に現れマススペクトルが対象物質と類似していた。各ピークのマススペクトルを図 8 に示す。

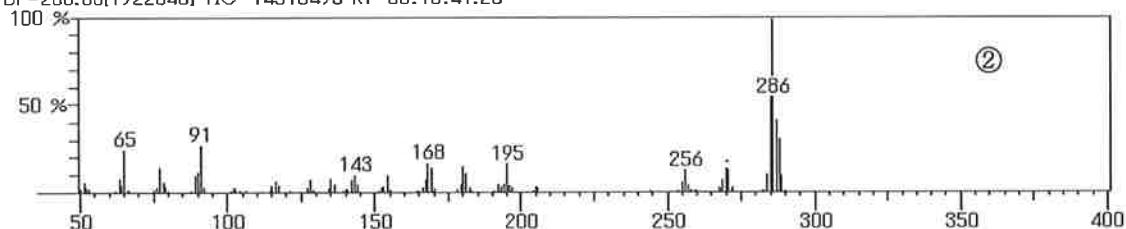
BP=258.00[4245248] TIC=26981606 RT=00:11:30.60



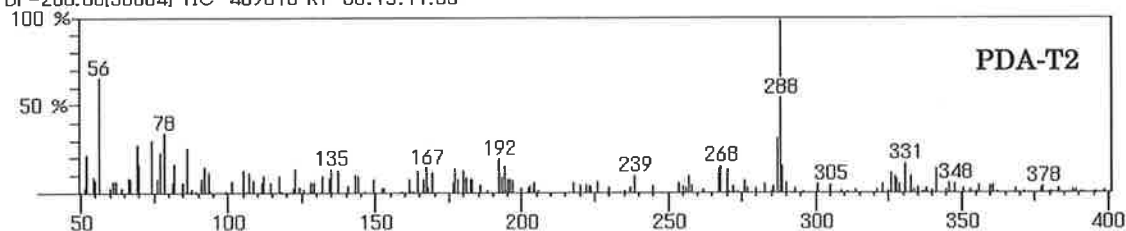
BP=260.00[148784] TIC=807861 RT=00:13:25.49



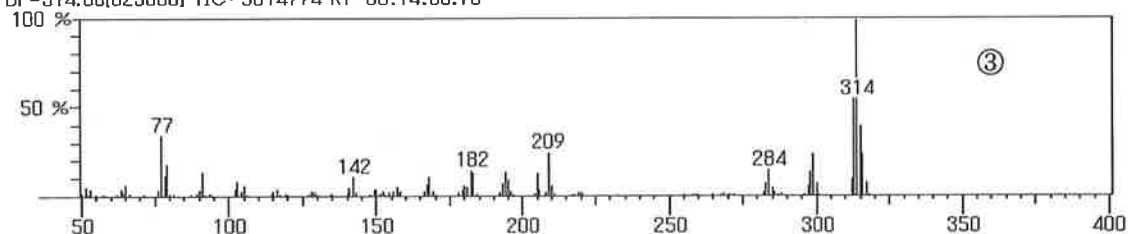
BP=286.00[1922048] TIC=14516493 RT=00:13:41.23



BP=288.00[36064] TIC=489616 RT=00:15:11.33



BP=314.00[623680] TIC=5014774 RT=00:14:36.70



BP=316.00[739712] TIC=2686637 RT=00:16:13.10

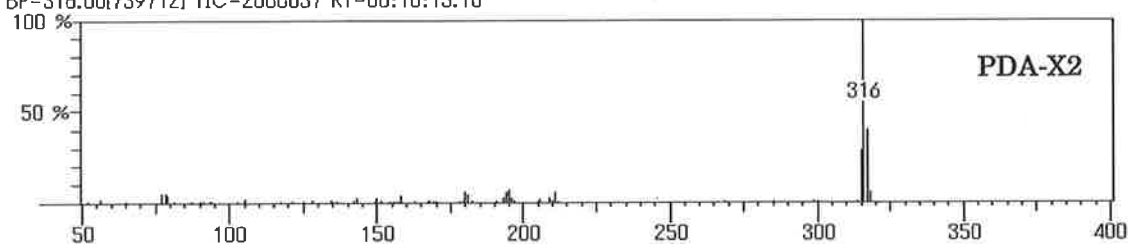
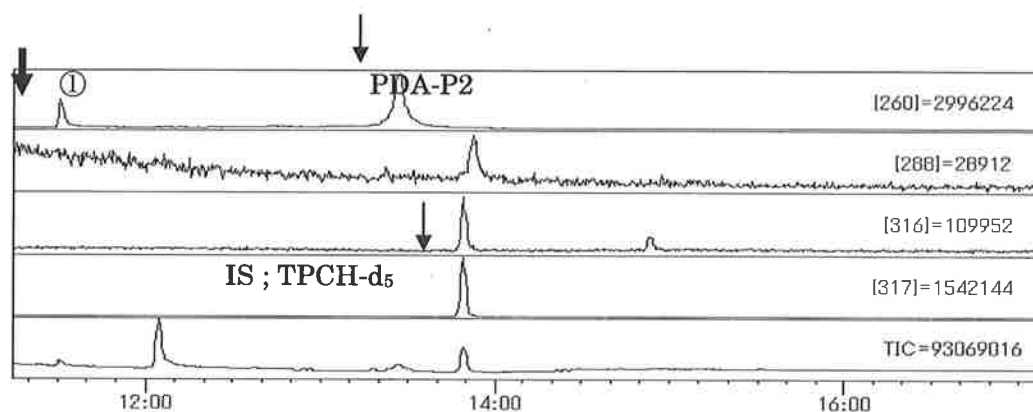
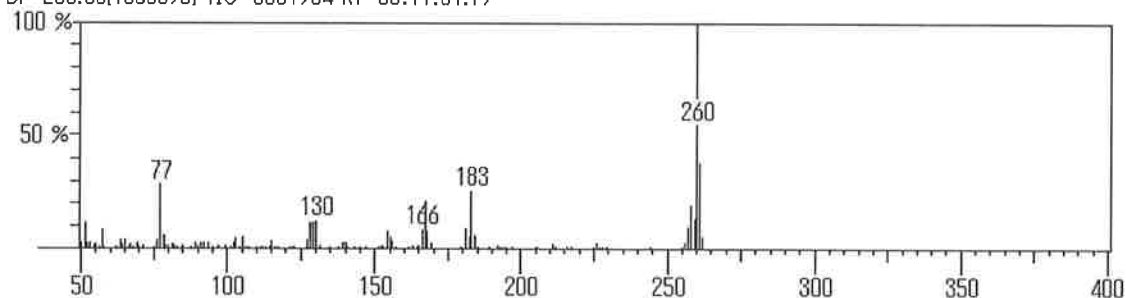


図8：対象物質3種の混合ヘキサン溶液フロリジルクリーンアップのマススペクトル



BP=260.00[1333696] TIC=8381964 RT=00:11:31.79



BP=260.00[2673152] TIC=10766664 RT=00:13:27.46

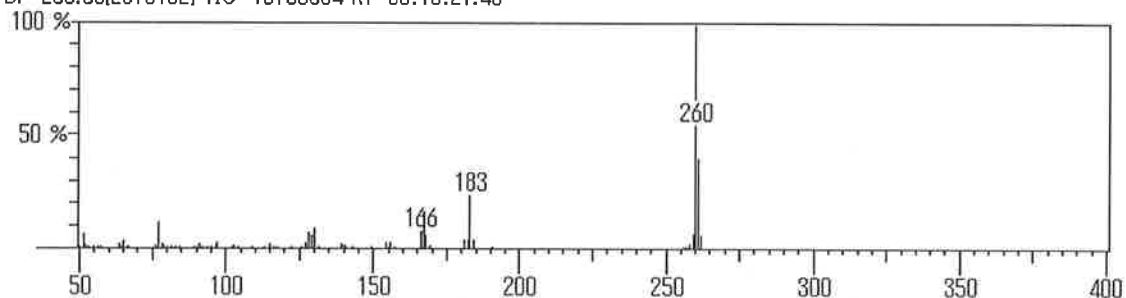


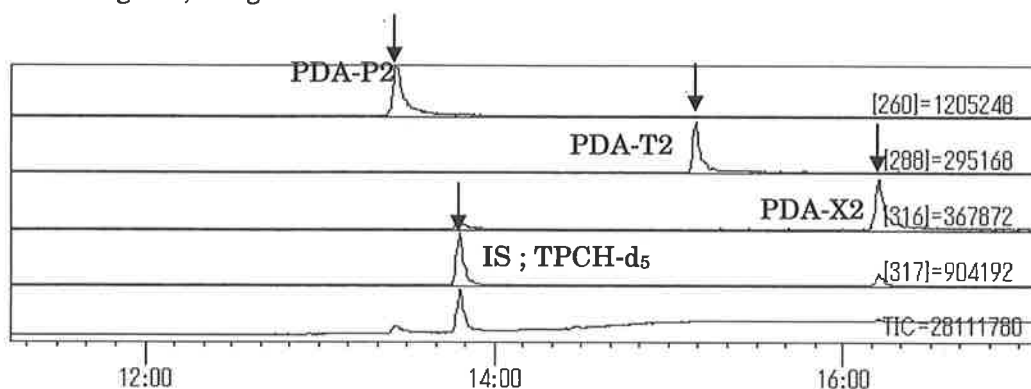
図 9 : PDA-P2 ヘキサン溶液フロリジルクリーンアップのマスキロマトグラム及びマススペクトル
(PDA-P2 ; 1 μ g/mL 添加)

speed control(+)有 (1drop/sec) 5%Ace/Hex50mL 溶出 open-column Florisil 5g

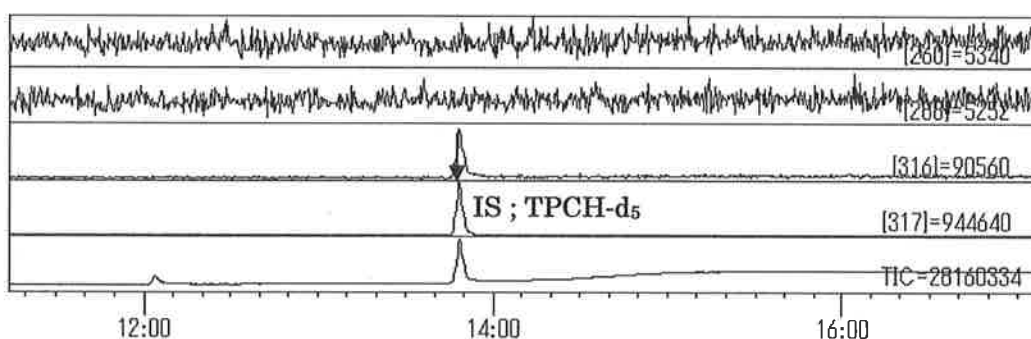
単独で PDA-P2 ; 1 μ g/mL を負荷し、底質及び生物試料のクリーンアップと同様の操作を行ったところ、前述の 3 種混合溶液と同様に回収率が 100%にならない現象が生じた。図 9 に 5%Ace/Hex50mL 溶出液のマスキロマトグラムを示す。保持時間の 2 分程度前に、先と同じく対象物質と類似のマススペクトル①が現れた。

288 及び 316 に小さなピークが現れているが、これは前図 : 8 の②③とは保持時間及びマススペクトルが異なっていた。

(1) std0.6ug/mL,1.2ug/mL



(2) blank-5%Ace/Hex



(3) blank-5%Ace/Hex+std0.6ug/mL,1.2ug/mL

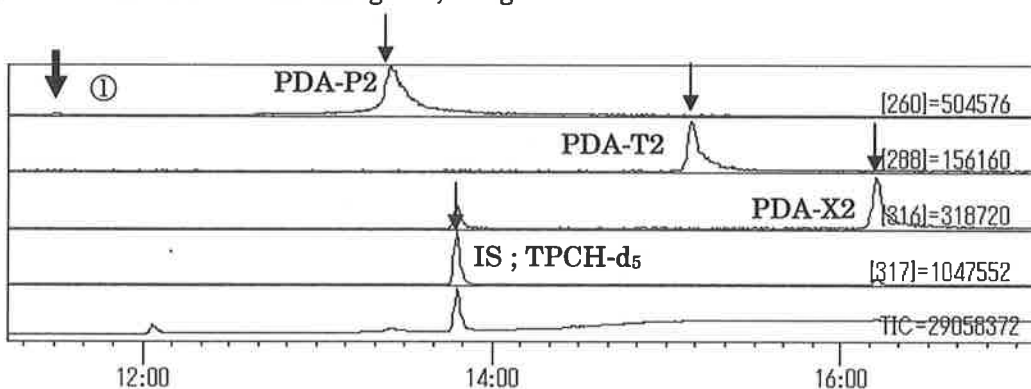


図 10 : std0.6ug/mL,1.2ug/mL ヘキササン溶液、blank-5%Ace/Hex 及び
blank-5%Ace/Hex+std0.6ug/mL,1.2ug/mL のマスクロマトグラム

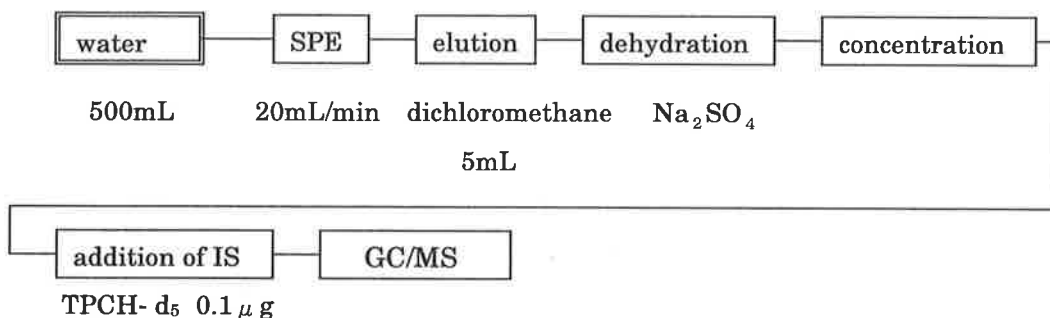
blank-5%Ace/Hex (図 10 (2)) では対象物質及び類似マススペクトルを持ついずれのピークも検出されなかった。一方、blank-5%Ace/Hex に対象物質を添加したサンプル (図 10 (3)) では PDA-P2 のピーク形状が乱れ、その保持時間の約 2 分前に類似マススペクトルを持つピークが検出された。ピーク形状は、標準物質 (図 10 (1)) とは異なっており、本物質が直接フロリジルカラムとの接触を持たなくともフロリジルカラムとの接触を持った 5%Ace/Hex との共存下において、性状が不安定になることが示された。

N, N' -Ditolyl-paraphenyldiamine (PDA-T2)
 N, N' -Dixyl-paraphenyldiamine (PDA-X2)
 N, N' -Diphenylparaphenyldiamine (PDA-P2)

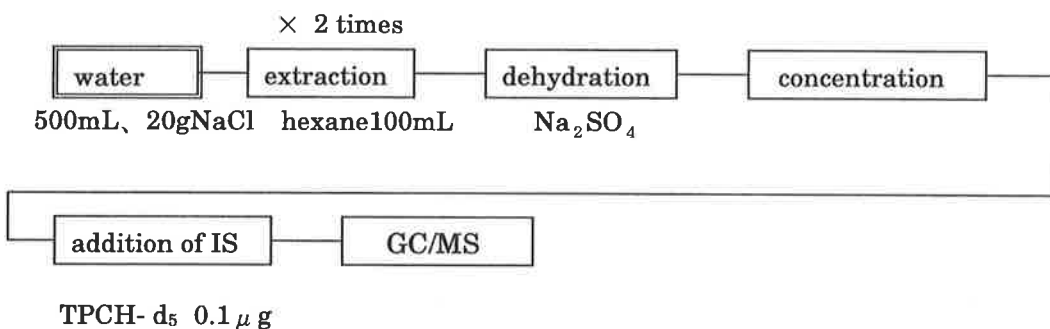
1. Flow chart

[water]

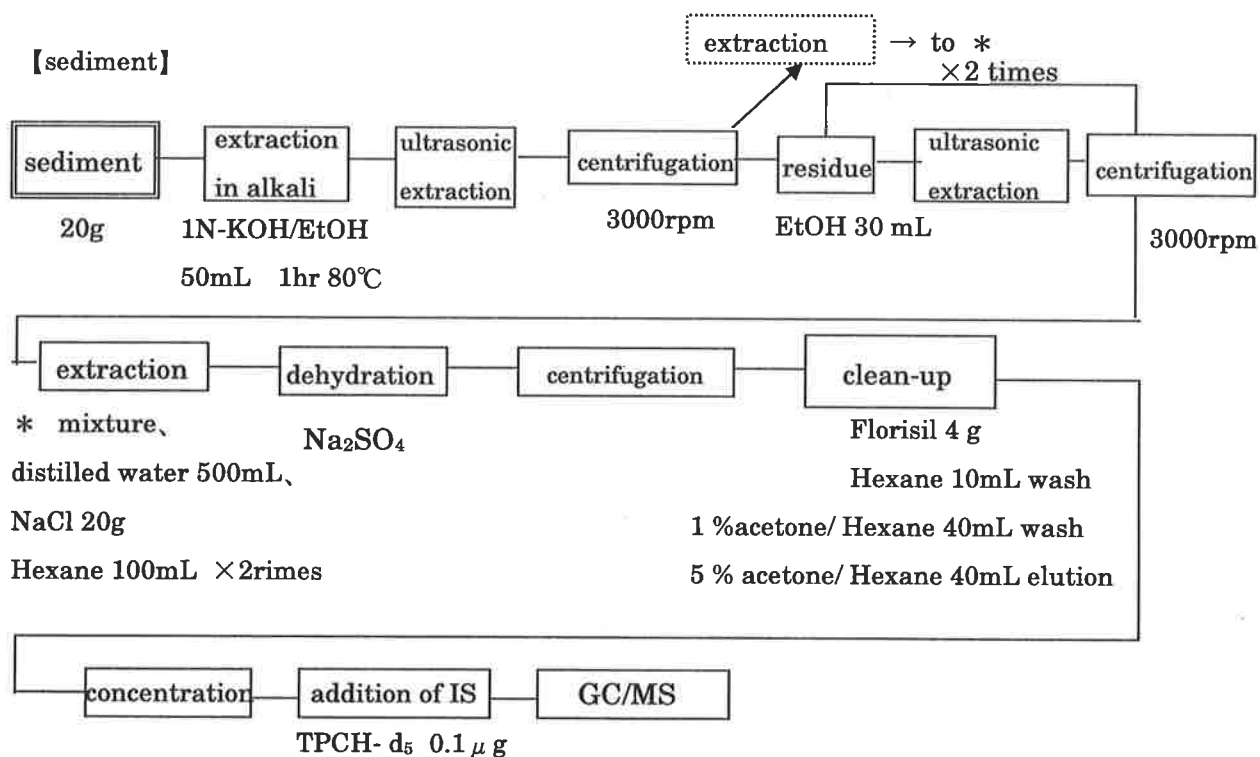
[solid phase extraction ; SPE]



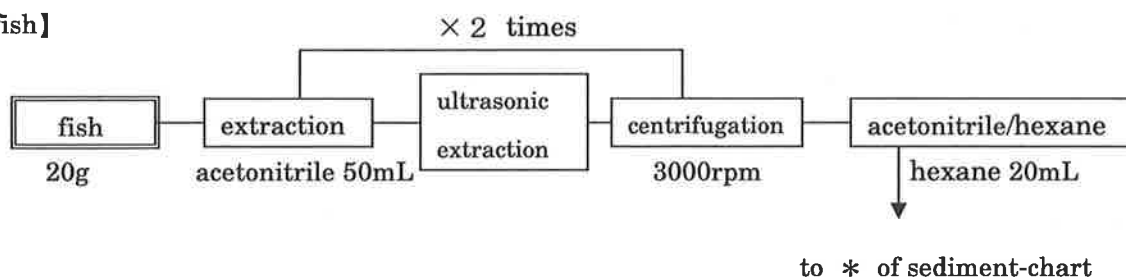
[liquid - liquid extraction ; LLE]



[sediment]



[fish]



2. Abstract

[Water]

(Solid -Phase Extraction) Adsorption was carried out by passing 500mL of the sample water through the cartridge (Aquisis PLS-3JR : GL science). The extract was eluted with 5mL of dichloromethane. The eluate was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and concentrated to 1mL using the TurboVap LV with nitrogen-gas. TPCH-d₅ was added as an internal standard to the resulting concentrate , and 2 μ L was then injected into the GC/MS for determination.

(Liquid - liquid Extraction) 500mL of water sample was put 20g NaCl (except sea water) , and was extracted with hexane 2 times. The hexane phase was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and concentrated to 1mL using the TurboVap LV with nitrogen-gas. TPCH-d₅ was added as an internal standard to the resulting concentrate , and 2 μ L was then injected into the GC/MS for determination.

[Sediment]

20g of the sediment sample was collected into a centrifugal sedimentation tube, 50mL alkali solution (1N-KOH ethanol solution) was added, and was extracted at 80°C for 1 hour. The tube was ultrasonically treated and then shaken, and centrifugal separation was thereafter carried out for 5 minutes at 3000rpm. The extract (ethanol phase) was subsequently separated off, another 30mL ethanol was added to the residue, and the preceding process was repeated. The extracted solution was combined into a 1-liter funnel separatory containing 500mL of distilled water including 20g NaCl, 100mL hexane was added to the funnel, and the funnel was shaken and then allowed to stand. The extract (hexane phase) was subsequently separated off and another 100mL hexane was added and the process was repeated. The hexane phase were combined and dehydrated with anhydrous sodium sulfate ,dried by addition of anhydrous sodium sulfate ; this was followed by concentration to 1mL using TurboVap II with nitrogen-gas, and followed by subjecting to clean up by Florisil column chromatography .The eluate was

concentrated preceding TurboVap II, and TPCH-d₅ was added as an internal standard to the resulting concentrate, which was then injected into determination the GC/MS for determination, as for the water sample.

[Fish sample]

A fish sample of 20g was collected into a centrifugal sedimentation tube, added 50mL acetonitrile. The tube was ultrasonically treated and then shaken, and centrifugal separation was thereafter carried out for 5minutes at 3000rpm. The extract (acetonitrile phase) was subsequently separated off, 50mL acetonitrile was added to the residue, and the preceding process was repeated, 2 times.

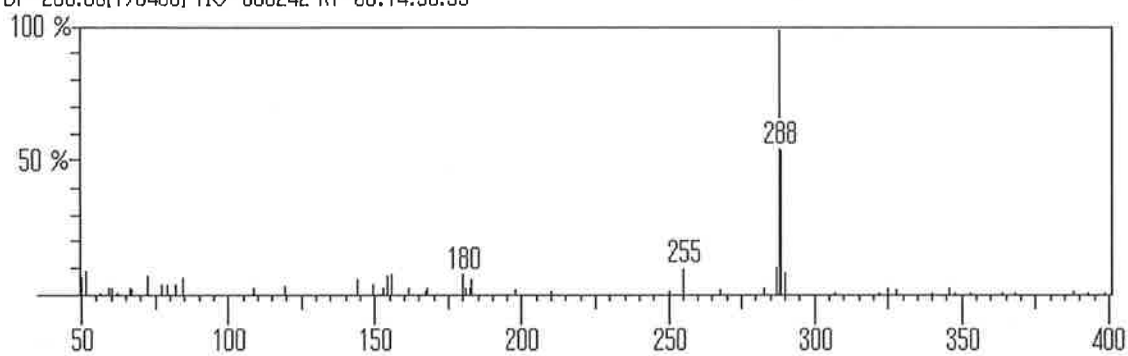
The extracted solution was combined into a 200mL funnel separatory, and was washed with 20mL hexane. The washed acetonitrile phase was put into 1-liter funnel separatory containing 500mL of distilled water including 20g NaCl, 100mL hexane was added to the funnel, and the funnel was shaken and then allowed to stand as for the sediment sample.. The extract (hexane phase) was subsequently separated off and another 100mL hexane was added and the process was repeated. The hexane phase were combined and dehydrated with anhydrous sodium sulfate, dried by addition of anhydrous sodium sulfate; this was followed by concentration to 1mL using TurboVap II with nitrogen-gas, and followed by subjecting to clean up by chromatography using Florisil. The eluate was concentrated preceding TurboVap II, and TPCH-d₅ was added as an internal standard to the resulting concentrate, which was then into determination the GC/MS for determination, as for the water sample.

物質名	分析法フローチャート	備考
N, N' - ジー (4-トリル) - パラ - フェニレンジアミン (PDA-T2)	[水質] ① 固相抽出法 <pre> graph LR A[水質試料 500mL] --> B[固相抽出 20mL/min] B --> C[溶出 ジクロロメタン 5mL] C --> D[②の*へ] </pre> ② 溶媒抽出法 <pre> graph LR A[水質試料 500mL, 20gNaCl] --> B[溶媒抽出 ×2回 ヘキサン 100mL] B --> C[振とう] C --> D[脱水 * Na2SO4] D --> E[濃縮] E --> F[内標準添加 TPCH-d5 0.1μg] F --> G[GC/MS] </pre>	GC/MS カラム: Agilent Ultra-2 カラム長: 25m 内径: 0.2mm 膜厚: 0.33 μm 検出限界 [水質] μg/L PDA-P2 0.006 PDA-T2 0.009 PDA-X2 0.020
	[底質] <pre> graph LR A[底質試料 20g] --> B[アルカリ分解 1N-KOH/EtOH 50mL] B --> C[超音波振とう] C --> D[遠心分離 3000rpm] D --> E[上澄液*へ] </pre> ×2回 <pre> graph LR A[残さ: 溶媒抽出 エタノール 30mL] --> B[超音波振とう] B --> C[遠心分離 3000rpm] </pre>	
	N, N' - ジフェニル - パラ - フェニレンジアミン (PDA-P2) <pre> graph LR A[ヘキサン転溶 *] --> B[脱水 Na2SO4] B --> C[濃縮] C --> D[クリーンアップ°] D --> E[GC/MS] </pre> 上澄液と混合、 精製水 500mL、20gNaCl ヘキサン 100mL * 2 フロリジル 4g に負荷 Hex 10mL 洗浄 1%アセトン/Hex 40mL 洗浄 5%アセトン/Hex 40mL 溶出	
N, N' - ジー (3,5-キシリル) - パラ - フェニレンジアミン (PDA-X2)	濃縮 内標準添加 TPCH-d5 0.1 μg GC/MS	[底質] μg/kg PDA-P2 0.39 PDA-T2 0.41 PDA-X2 0.37
	[生物] <pre> graph LR A[生物試料 20g] --> B[溶媒抽出 アセトニトリル 50mL] B --> C[超音波振とう ×2回] C --> D[遠心分離 3000rpm] D --> E[アセトニトリル/ヘキサン分配] E --> F[底質の*へ アセトニトリル抽出液に ヘキサン 20mL を加え軽く振とう] </pre>	

マススペクトル付属データ

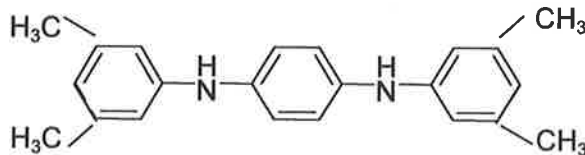
測定機関名	兵庫県立健康環境科学研究所センター		
住所及び電話番号	神戸市須磨区行平町3丁目1-27 078-735-6918		
測定者	吉田光方子	測定年月日	平成16年1月21日
物質名(英語)	N, N'-ジ-(4-トリル)-パラフェニレンジアミン N, N'-Di-(4-tolyl)-paraphenyldiamine		
別名(英語)			
分子式	C ₂₀ H ₂₀ N ₂	分子量	288.29
CAS登録番号	27417-40-9		
GC/MS 測定条件			
・ 使用機種 GC ; HP5890 II、MS ; JMS-AM II 150			
・ 使用カラム SUPELCO eQUITY5(長さ 30m 内径 0.2mm 膜厚 0.2 μm)			
・ カラム温度 50 °C(1min)→30 °C/min→250 °C→5 °C/min→280 °C→ 30 °C/min → 300 °C(5min)			
・ 注入口温度 200 °C			
・ 注入量 2 μL			
・ インターフェース温度 250 °C			
・ キャリアガス He (流量 1mL/min)			
・ 注入方法 スプリットレス(パージタイム 1.5min)			
・ 炉源温度 230 °C			
・ 炉化電流 300 μA			
構造式			
			

BP=288.00[193408] TIC=680242 RT=00:14:56.55

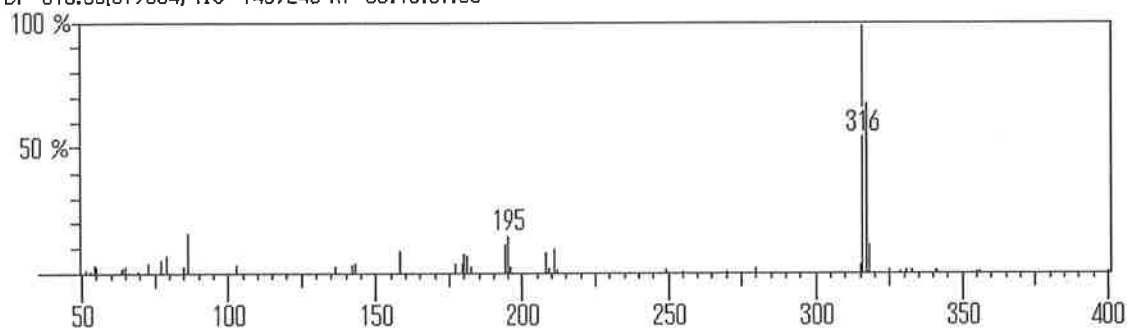


Mass	Intensity	Int.(%)
50	14208	7.35
51	18432	9.53
66	6256	3.23
72	14528	7.51
77	8192	4.24
79	9632	4.98
82	8768	4.53
84	14336	7.41
108	6448	3.33
119	8000	4.14
144	13504	6.98
149	8704	4.50
153	6176	3.19
154	14464	7.48
156	17024	8.80
161	6592	3.41
168	5984	3.09
180	16160	8.36
181	5888	3.04
183	12160	6.29
255	20640	10.67
283	6528	3.38
287	20944	10.83
288	193408	100.00
289	106368	55.00
290	17728	9.17
325	6240	3.23
346	6400	3.31

マススペクトル付属データ

測定機関名	兵庫県立健康環境科学研究所センター		
住所及び電話番号	神戸市須磨区行平町3丁目1-27 078-735-6918		
測定者	吉田光方子	測定年月日	平成16年1月21日
物質名(英語)	N, N'-ジ(3,5-キシリル)-パラフェニレンジアミン N, N'-Di-(3,5-xyllyl)-paraphenyldiamine		
別名(英語)			
分子式	C ₂₂ H ₂₄ N ₂	分子量	316.44
CAS登録番号	7029-05-0		
GC/MS 測定条件			
・ 使用機種 GC ; HP5890 II、MS ; JMS-AM II 150			
・ 使用カラム SUPELCO eQUITY5(長さ 30m 内径 0.2mm 膜厚 0.2 μm)			
・ カラム温度 50 °C(1min)→30 °C/min→250 °C→5 °C/min→280 °C→ 30 °C/min → 300 °C(5min)			
・ 注入口温度 200 °C			
・ 注入量 2 μL			
・ インターフェース温度 250 °C			
・ キャリヤガス He (流量 1mL/min)			
・ 注入方法 スプリットレス(パージタイム 1.5min)			
・ イオン源温度 230 °C			
・ イオン化電流 300 μA			
構造式			
			

BP=316.00(379584) TIC=1459248 RT=00:15:57.55

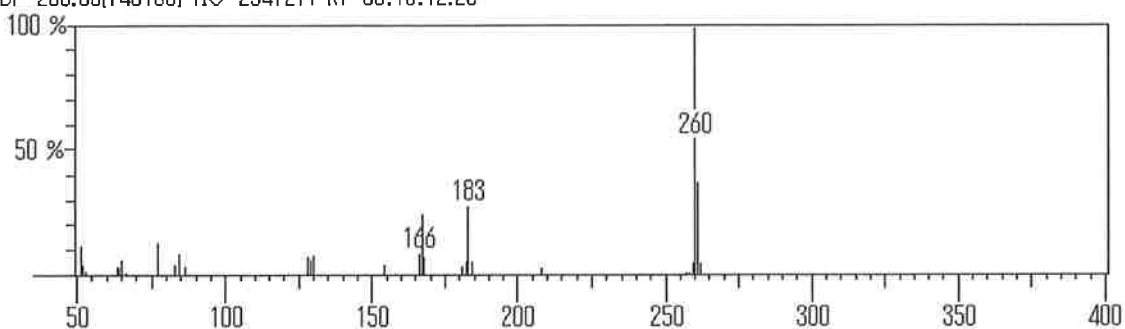


Mass	Intensity	Int.(%)
54	15840	4.17
55	12928	3.41
65	12192	3.21
73	16384	4.32
77	22976	6.05
79	29408	7.75
86	63488	16.73
103	15744	4.15
136	14176	3.73
142	15832	4.17
143	17120	4.51
158	35968	9.48
177	17664	4.65
179	18176	4.79
180	31424	8.28
181	29152	7.68
182	13080	3.45
194	45824	12.07
195	59712	15.73
196	13920	3.67
208	34816	9.17
211	39584	10.43
315	14688	3.87
316	379584	100.00
317	262304	69.10
318	45680	12.03

マスペクトル付属データ

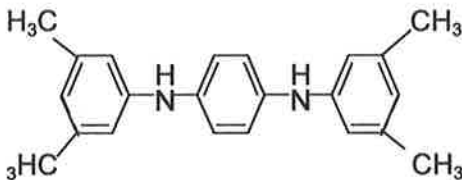
測定機関名	兵庫県立健康環境科学研究所センター		
住所及び電話番号	神戸市須磨区行平町3丁目1-27 078-735-6918		
測定者	吉田光方子	測定年月日	平成16年1月21日
物質名(英語)	N, N' -ジフェニルパラフェニレンジアミン N, N' -Diphenylparaphenyldiamine		
別名(英語)			
分子式	C ₁₈ H ₁₆ N ₂	分子量	260.34
CAS登録番号	74-31-7		
GC/MS 測定条件			
・ 使用機種 GC ; HP5890 II、MS ; JMS-AM II 150			
・ 使用カラム SUPELCO eQUITY5(長さ 30m 内径 0.2mm 膜厚 0.2 μm)			
・ カラム温度 50 °C(1min)→30 °C/min→250 °C→5 °C/min→280 °C→ 30 °C/min → 300 °C(5min)			
・ 注入口温度 200 °C			
・ 注入量 2 μL			
・ インターフェース温度 250 °C			
・ キャリアガス He (流量 1mL/min)			
・ 注入方法 スプリットレス(パージタイム 1.5min)			
・ イオン源温度 230 °C			
・ イオン化電流 300 μA			
構造式			
			

BP=260.00[743168] TIC=2547277 RT=00:13:12.26



Mass	Intensity	Int.(%)
51	90112	12.13
52	32896	4.43
63	31072	4.18
65	23488	3.16
65	50304	6.77
77	98880	13.31
83	35328	4.75
84	67584	9.09
86	30720	4.13
128	56000	7.54
129	47792	6.43
130	65888	8.87
154	31296	4.21
166	66000	8.88
167	186208	25.06
168	56640	7.62
181	28960	3.90
182	43464	5.85
183	209152	28.14
184	43904	5.91
259	41344	5.56
260	743168	100.00
261	279424	37.60
262	41088	5.53

研究機関名 担当者名	兵庫県立健康環境科学研究所センター 吉田 光方子					
性状項目	n-オクタノール/水分配係数					
化学物質名	N, N' -ジ- (4-トリル) -パラフェニレンジアミン (PDA-T2)					
測定法	高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)					
測定結果	log Pow = 3.60					
測定回数	3 回					
試薬とその純度 (株) 分 析 条 件 分 析 機 器 HP1100 分 析 条 件 カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 内径 4.6 * 長さ 150mm 溶離液: 20%含水メタノール 流 速: 0.7mL/min.	構造式 					
分析法の概要 オクタノール/水分配係数が既知の標準物質 (ベンゼン、ブロモベンゼン、p,p'-DDE、ヘキサクロロベンゼン) 及びN, N' -ジ- (4-トリル) -パラフェニレンジアミンの保持時間を測定し、標準物質の分配係数保持時間の関係から目的物質の分配係数を求めた。 標準溶液の調製 標準物質をアセトニトリルに溶解し、20 µg/mL の溶液を調製した。						
測定結果(log Pow)						
検体番号	1	2	3	4	平均値	標準偏差
測定値 1	3.583					
測定値 2	3.598					
測定値 3	3.610					
平均値	3.60				3.60	0.011
その他						

研究機関名 担 当 者 名	兵庫県立健康環境科学研究所センター 吉田 光方子					
性状項目	n-オクタノール/水分配係数					
化学物質名	N, N' -ジ- (3,5-キシリル) -パラフェニレンジアミン(PDA-X2)					
測定法	高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)					
測定結果	log Pow = 4.41					
測定回数	3 回					
試薬とその純度 (株) 分 析 条 件 分 析 機 器 HP1100 分 析 条 件 カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 内径 4.6 * 長さ 150mm 溶離液: 20%含水メタノール 流 速: 0.7mL/min.	構造式 					
分析法の概要 オクタノール/水分配係数が既知の標準物質 (ベンゼン、ブロモベンゼン、p,p'-DDE、ヘキサクロロベンゼン) 及びN, N' -ジ- (3,5-キシリル) -パラフェニレンジアミンの保持時間を測定し、標準物質の分配係数保持時間の関係から目的物質の分配係数を求めた。 標準溶液の調製 標準物質をアセトニトリルに溶解し、20 µg/mL の溶液を調製した。						
測定結果(log Pow)						
検体番号	1	2	3	4	平均値	標準偏差
測定値 1	4.480					
測定値 2	4.392					
測定値 3	4.364					
平均値	4.41				4.41	0.049
その他						

研究機関名 担 当 者 名	兵庫県立健康環境科学研究所 センター		吉田 光方子			
性状項目	n-オクタノール/水分配係数					
化学物質名	N, N' - ジフェニル-パラ-フェニレンジアミン (PDA-P2)					
測定法	高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)					
測定結果	log Pow = 2.79					
測定回数	3 回					
試薬とその純度 (株) 分 析 条 件 分 析 機 器 HP1100 分 析 条 件 カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 内径 4.6 * 長さ 150mm 溶離液: 20% 含水メタノール 流 速: 0.7mL/min.	構造式 					
分析法の概要 オクタノール/水分配係数が既知の標準物質 (ベンゼン、ブロモベンゼン、p,p'-DDE、ヘキサクロロベンゼン) 及び N, N' - ジフェニル-パラ-フェニレンジアミンの保持時間を測定し、標準物質の分配係数保持時間の関係から目的物質の分配係数を求めた。 標準溶液の調製 標準物質をアセトニトリルに溶解し、20 µg/mL の溶液を調製した。						
測定結果(log Pow)						
検体番号	1	2	3	4	平均値	標準偏差
測定値 1	2.788					
測定値 2	2.789					
測定値 3	2.789					
平均値	2.79				2.79	0.0004
その他						