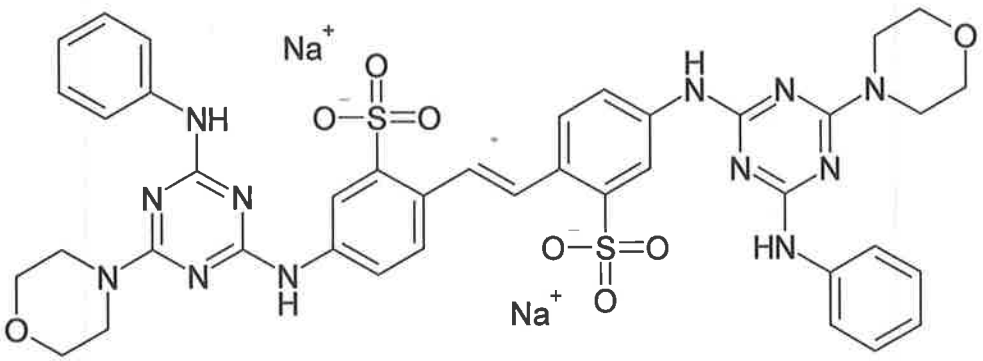
ジナトリウム=2,2'-ビニレンビス[5-（4-モルホリノ-6-アニリノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノ）ベンゼンスルホナート]

2,2'-Vinylenebis[5-(4-morpholino-6-anilino-1,3,5-triazin-2-ylamino)benzenesulfonic Acid Disodium Salt]

（別名：フルオレスセント 260）

【対象物質の構造】



[CAS 番号：16090-02-1]　$C_{40}H_{38}N_{12}O_8S_2.2Na$

【物理化学的性状】

物質名	分子量	沸点（℃）	蒸気圧	水溶解度（mg/L）	log P_{ow}
ジナトリウム=2,2'-ビニレンビス[5-(4-モルホリノ-6-アニリノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノ)ベンゼンスルホナート]	924.9	－	－	5	1.48（実測値）

PRTR法指定化学物質有害性データ

【毒性】

【暴露経路】体内への吸収経路：経皮。**【吸入の危険性】**20 ℃ではほとんど気化しない。

【用途】染料

§1　分析法

（1）分析法概要

大気試料は、エムポア TM ディスク SDB-XD に環境大気を 1 L/min の一定流量、24 時間採取で 1.44 m^3 通気して対象物質を捕集する。このエムポア TM ディスク SDB-XD をビーカーに移し、対象物質をメタノールで超音波抽出させ、抽出液を濃縮後、LC/MS/MS　ESI-SRM で測定する。

（2）試薬・器具

フルオレスセント 260：TINOPAL　AMS-GX　（Ciba　Specialty　Chemicals 社製）
アセトン：残留農薬試験用
メタノール：高速液体クロマトグラフィー用
エムポア TM ディスク SDB-XD：　47 φ（3M 社製）
ろ紙ホルダーにセットした後、メタノール 30 mL で洗浄して使用する。

【試薬の安定性・毒性】

皮膚に付着しないよう取り扱いには注意する。取り扱いは遮光して行う。

【器具】

ろ紙ホルダー　EMI-47・EMO-47　GL Sciences 社製

ホールピペット、メスフラスコ、ナス型フラスコ、目盛付試験管、ロータリーエバポレータ、パスツールピペット、窒素濃縮装置

※　使用する器具は、あらかじめアセトンで洗浄し、乾燥させてから使用する。

（3）分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

【試料捕集方法】

大気試料採取用ホルダーにエムポア TM ディスク SDB-XD をセットし、メタノール 30 mL で洗浄する。十分に乾燥させた後、1 L/min で 24 時間大気試料を採取する。

【試料の前処理及び試料液の調製】

大気試料を捕集したエムポア TM ディスク SDB-XD を 100 mL ビーカーに移し、メタノール 10 mL で 10 分間、超音波抽出を行う。抽出液をナス型フラスコに移し、再度、メタノール 10 mL で超音波抽出を行う。この操作を合計 3 回行い、抽出液をナス型フラスコに移す。抽出液をロータリーエバポレータで 2 mL 程度まで濃縮し、10 mL の目盛付試験管に移す。更に窒素ガスを吹付けて 1 mL まで濃縮し（注 1）、LC/MS/MS で測定する。

【空試験液の調製】

大気試料採取用のエムポア TM ディスク SDB-XD を 100 mL ビーカーに入れ、メタノール 10 mL で超音波抽出 (10 min) を 3 回行う。抽出液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータで 2 mL 程度まで濃縮し、10 mL の目盛付試験管に移す。更に窒素ガスを吹付けて 1 mL まで濃縮して得られた試料液を空試験液とする。

【標準液の調製】

〔標準原液〕

標準物質（フルオレスセント 260）としてフルオレスセント 260（Ciba Specialty Chemicals 社製）を用いて、100 μg/mL 標準原液を作成する。

フルオレスセント 260 標準原液は以下の方法で作成する。フルオレスセント 260 を 10.0 mg 正確に秤取り（有効数字 3 桁)、100 mL 全量フラスコに入れ、メタノールを用いて溶解する。尚、濃度の許容誤差を 10%以下にできる他の計量器を用いてもよい。

〔検量線用標準液〕

標準原液をメタノールで順次希釈し、0.5 ng/mL から 50 ng/mL の標準液を作成した。

【測定】

〔LC/MS/MS 測定条件〕

測定機器　LC：Agilent-1100
　　MS/MS：API4000

使用カラム：関東化学株式会社　Mightysil　RP-4　GP　4.6×150 mm, 5 μm

移動相　：　A：水（10 mM 酢酸アンモニウム）　B：メタノール

0→8 min	A：B＝35：65
8→8.5 min	A：35→0　B：65→100　linear　gradient
8.5→14 min	A：B＝0：100
14→14.1 min	A：0→35　B：100→65　linear　gradient
14.1→20 min	A：B＝35：65

カラム温度：40 ℃

流速：0.4 mL/min

試料注入量：20 μL

測定モード：ESI-Negative　SRM

オリフィスプレートにかかる電圧：-75 V

四重極にかかる電圧：-10 V

コリジョンエネルギー：-72 V　(879.1＞799.5)
　　-88 V　(879.1＞569.3)
　　-40 V　(439.1＞284.2)

カーテンガス流量：20 psi

コリジョンガス圧：8
イオンスプレーの電圧：-4500 V
インターフェース温度：700 ℃
ネブライザーのガス圧：50 psi
ターボガス圧：80 psi
モニターイオン：フルオレスセント 260
879.1＞799.5、879.1＞569.3、439.1＞284.2

〔検量線〕

フルオレスセント 260 標準原液（100 μg/mL）をメタノールで希釈し、0.5～50 ng/mL の範囲に亘る 4 種類以上の濃度で、検量線用標準溶液を調製する。

溶媒ブランクとしてのメタノールを含めて、5 種類以上の検量線用標準溶液 20 μL を LC/MS/MS に導入して分析する。溶媒ブランク試料からは被検物質のピークが検出されない事を確認する。

得られる各クロマトグラムにおいて、標準物質のピーク面積を読み取り、検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準溶液に含まれる標準物質の濃度を読み取り、検量線の横軸とする。重み付けなしで、最小二乗法により、原点を通過する一次の検量線を作成し、関係式及び寄与率（r^2）を計算する。寄与率が 0.995 以上であることを確認する。

〔定量〕

試料液 20 μL を LC/MS/MS に導入して分析する。得られた被検物質のピーク面積から、検量線を基にして、被検物質濃度を求める。

〔濃度の算出〕

大気中の物質濃度 C (ng/m^3)は次式により算出する。

$$C = ((Q_a - Q_b)/V) \times ((273+t)/(273+20.0)) \times (101/P)$$

Q_a：検量線から求めた被検物質濃度(ng/mL) ×試料液の最終液量（mL）
Q_b：検量線から求めた操作ブランクの被検物質濃度(ng/mL) ×試料液の最終液量（mL）
V：試料量(m^3)
t：捕集時の平均気温(℃)
P：捕集時の平均気圧(kPa)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$V = 1.44$ (m^3)

即ち、

$$C = (Q_a - Q_b)/1.44 \times ((273+t)/(273+20.0)) \times (101/P) \text{ (ng/m}^3\text{)}$$

である。

〔装置検出限界（IDL）〕
本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 1 に示す（注 2）。

表 1　装置検出下限（IDL）

物質名	IDL（ng/mL）	捕集量（m^3）	試料濃度換算値（ng/m^3）
ﾌﾙｵﾚｽｾﾝﾄ 260	0.033	1.44	0.023

〔測定方法の検出下限（MDL）〕
本分析法の検出下限（MDL）及び定量下限（MQL）を表 2 に示す（注 3）。

表 2　検出下限（MDL）及び定量下限（MQL）

物質名	大気（ng/m^3）	
	検出下限（MDL）	定量下限（MQL）
ﾌﾙｵﾚｽｾﾝﾄ 260	0.33	0.84

注解

（注1）粉塵が多い場合は、AUTOVIAL5 などのフィルターでろ過を行う。

（注2）装置検出限界（IDL）は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き　平成 17 年 3 月」に従い、表 3 のとおり算出した。また、そのクロマトグラムを図 1 に示す。

表 3　装置検出限界（IDL）の算出

物質名	フルオレスセント 260
捕集量（m^3）	1.44
最終液量（mL）	1.0
注入濃度（ng/mL）	0.50
装置注入量（μL）	20.0
結果 1　（ng/mL）	0.458
結果 2　（ng/mL）	0.453
結果 3　（ng/mL）	0.458
結果 4　（ng/mL）	0.453
結果 5　（ng/mL）	0.469
結果 6　（ng/mL）	0.441
結果 7　（ng/mL）	0.455
平均値　（ng/mL）	0.4554
標準偏差	0.0085
IDL（ng/mL）	0.033
IDL 試料換算値（ng/m^3）	0.023
S/N	15.7
CV（%）	1.9

※　IDL=t（n-1,0.05）×σ_{n-1}×2

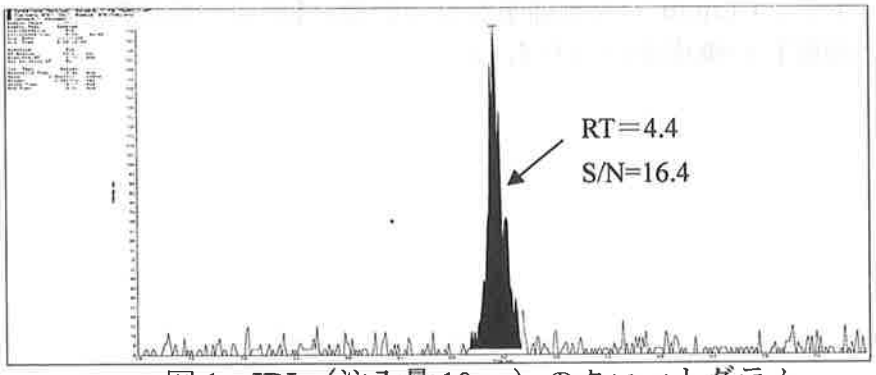


図 1　IDL（注入量 10 pg）のクロマトグラム

（注3）分析法の検出下限（MDL）は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き　平成17年3月」に従い、表4のとおり算出した。

表4　検出下限（MDL）及び定量下限（MQL）の算出

物質名	フルオレスセント260
捕集量（m^3）	1.44
標準添加量（ng）	2.5
試料換算濃度（ng/m^3）	1.74
最終液量（mL）	1.0
注入液濃度（ng/mL）	2.5
装置注入量（μL）	20.0
操作ブランク（ng/m^3）	0.089
無添加（ng/m^3）	0.22
結果1（ng/m^3）	1.64
結果2（ng/m^3）	1.45
結果3（ng/m^3）	1.52
結果4（ng/m^3）	1.43
結果5（ng/m^3）	1.60
結果6（ng/m^3）	1.61
結果7（ng/m^3）	1.59
平均値（ng/m^3）	1.550
標準偏差	0.084
MDL（ng/m^3）	0.33
MQL（ng/m^3）	0.84
S/N	75.7
CV（%）	5.4

※ MDL＝t（n-1,0.05）×σ_{n-1}×2

※ MQL＝σ_{n-1}×10

※ 無添加試料　：

大気試料採取用ホルダーにエムポア™ディスク SDB-XD をセットし、1 L/min で大気捕集を行った後、【試料の前処理及び試料液の調製】の操作を行ったもの。

§２　解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図２に示す。

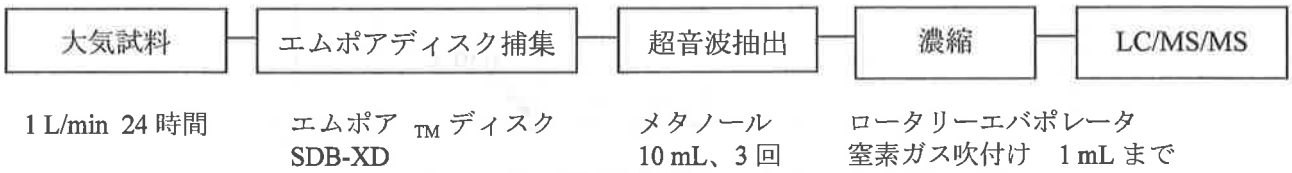


図２　分析フロー

〔検量線及びマススペクトル〕

図３に検量線、図４、５に対象物質の MS スペクトル、MS/MS スペクトルを示す。

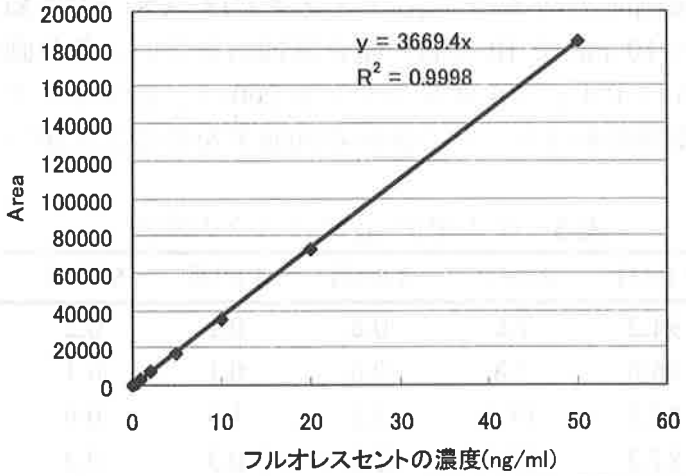


図3　フルオレスセント260の検量線

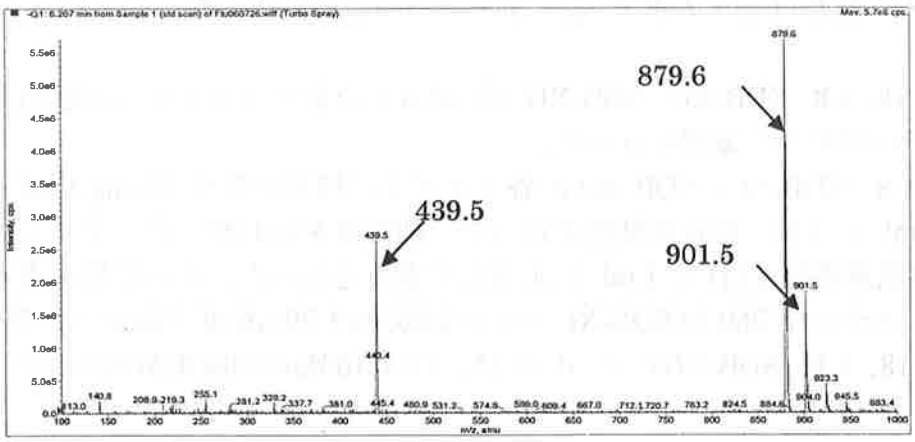


図4　フルオレスセント260のMSスペクトル

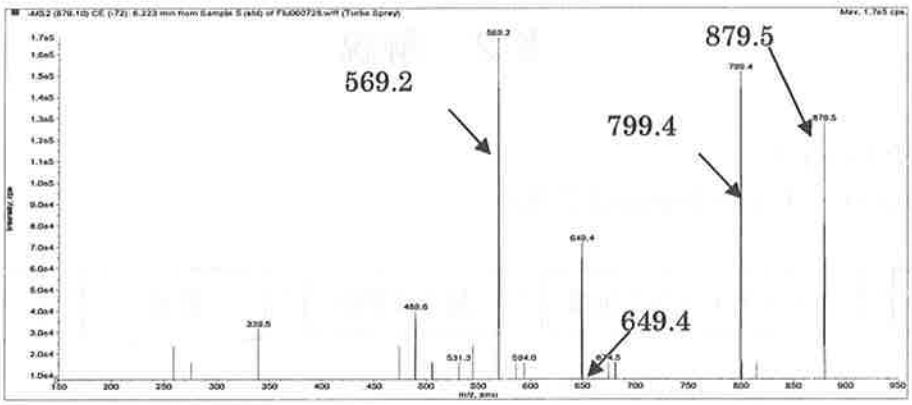


図5　フルオレスセント260のMS/MSスペクトル

〔捕集用ディスクの検討〕

エムポア TM ディスクを用いて大気捕集を行うため、ディスクからの溶出条件について検討を行った。

標準液 500 ng を添加したエムポア TM ディスク C18、C8、SDB-XC、SDB-XD（各 47 φ）をメタノール 10 mL で 10 分間、超音波抽出を行い、各分画の溶出量を求めた。その結果を表 5 に示す。フルオレスセント 260 は、各ディスクからメタノール 10 mL で 3 回超音波抽出を行うことで良好な回収率を得ることができた。

表 5　エムポア TM ディスクの検討

	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	Total
C18	94.2	7.6	0.6	0.1	0.2	103
C8	96.0	7.8	0.6	0.1	0.1	105
SDB-XC	82.3	15.6	3.5	1.3	0.9	104
SDB-XD	87.2	17.7	2.5	0.3	0.2	108

※　添加量　500 ng
※　表中の数字は回収率（%）
※　回数は各エムポア TM ディスクの超音波抽出回数

次に C18、C8、SDB-XC、SDB-XD（各 47 φ）の各ディスクからの溶出について、低濃度での回収率の確認を行った。

C18、C8、SDB-XC、SDB-XD の各ディスクに標準物質を 2.5 ng 添加し、メタノール 10 mL で 3 回、超音波抽出を行った。抽出液をあわせ、ロータリーエバポレータ、及び窒素濃縮を行い、1 mL に定容して測定を行った。その結果を表 6 に示す。フルオレスセント 260 の SDB-XC からの回収率は 70%程度と低かったが、他のディスク（C18、C8、SDB-XD）については、ほぼ 100%の回収率が得られた。

表 6　ディスクの検討

	回収率（%）
C18	108.7
C8	97.5
SDB-XC	69.4
SDB-XD	99.6

※　添加量 2.5 ng

〔捕集速度の検討〕

大気捕集を行う時の捕集速度の影響について検討を行った。

〔捕集用ディスクの検討〕で良好な回収率の得られたエムポア TM ディスク C18、C8、SDB-XD（各 47 φ）に標準液を添加し、大気捕集用のホルダーにセットした後、0.1、0.15、0.5、1 L/min の各流速で 3 時間、大気捕集を行った。その結果を表 7 に示す。3 時間の大気捕集では、捕集速度による影響はなく、良好な結果を得ることができた。

表 7　大気捕集速度の影響

	0.1 L/min	0.15 L/min	0.5 L/min	1 L/min
C18	92.4	100.7	97.2	85.8
C8	105.9	101.1	93.4	100.7
SBX-XD	91.4	99.8	99.6	96.1

※　添加量　10 ng

※　表中の数字は回収率（%）

〔捕集時間の検討〕

エムポア TM ディスク C8 と SDB-XD について 1 L/min で大気捕集を行った時の経時変化について確認を行った。

標準液を 10 ng 添加した C8、SDB-XD ディスクを大気捕集用のホルダーにセットし、1 L/min の流速で 0、1、3、5、10、24 時間、大気捕集を行った。その結果を図 6～7 に示す。大気捕集時間と共に回収率の低下がみられたが、SDB-XD ディスクによる大気捕集では、24 時間後でも初期濃度の 74%の回収率が得られた。

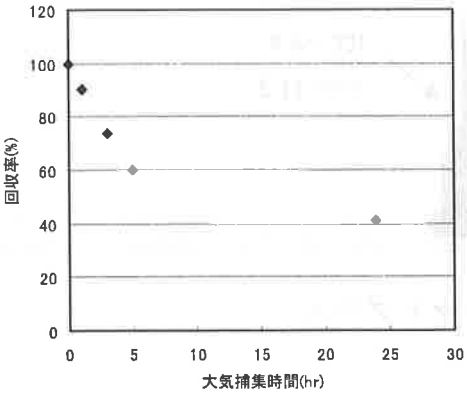


図 6　エムポア TM ディスク C8 大気捕集の経時変化

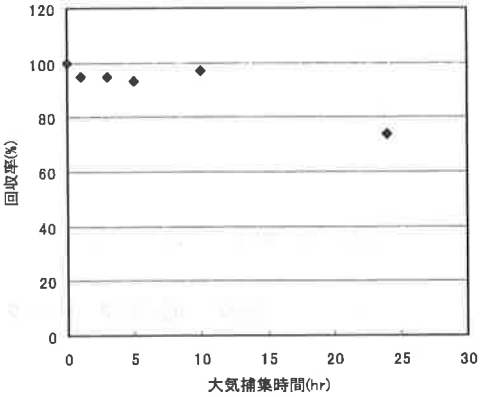


図 7　エムポア TM ディスク SDB-XD 大気捕集の経時変化

〔添加回収実験結果（大気試料）〕

CI-フルオレスセントの標準液を SDB-XD ディスクに 10 ng 添加し、1 L/min で 24 時間大気捕集を行い回収試験を行った。結果を表 8 に示す。高温、高湿度の条件でも良好な回収率を得ることができた。

表 8　添加回収試験結果

試料名	試料量 (m^3)	添加量 (ng)	試料数	検出濃度 (ng/m^3)	回収率 (%)	変動係数 (%)
大気試料	1.44	無添加	2	N.D	–	–
*1	1.44	10	6	5.0	70.3	2.9
*2	1.44	2.5	7	1.55	89.1	5.4

*1　気温 30 ℃、湿度 80%

*2　気温 14.2 ℃、湿度 62%

〔標準溶液、環境試料及び添加回収試験のクロマトグラム〕

図 8～11 に標準溶液、操作ブランク、大気試料（無添加）、及び添加回収試験試料（大気試料（添加））測定時のクロマトグラムを示す。

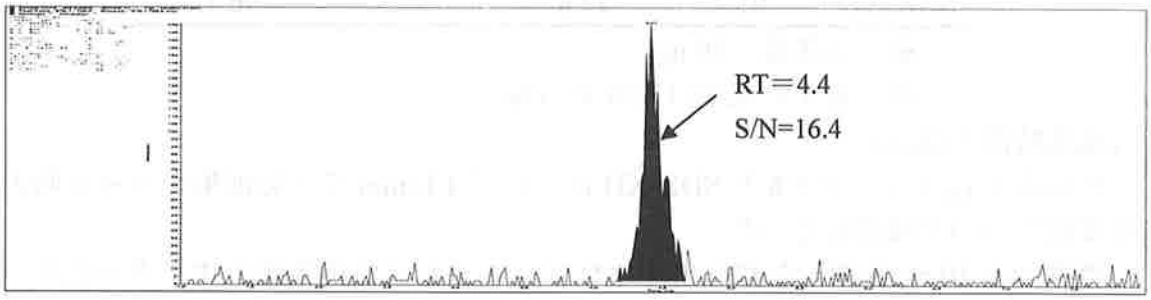


図 8　標準溶液のクロマトグラム（対象物質 0.5 ng/mL）

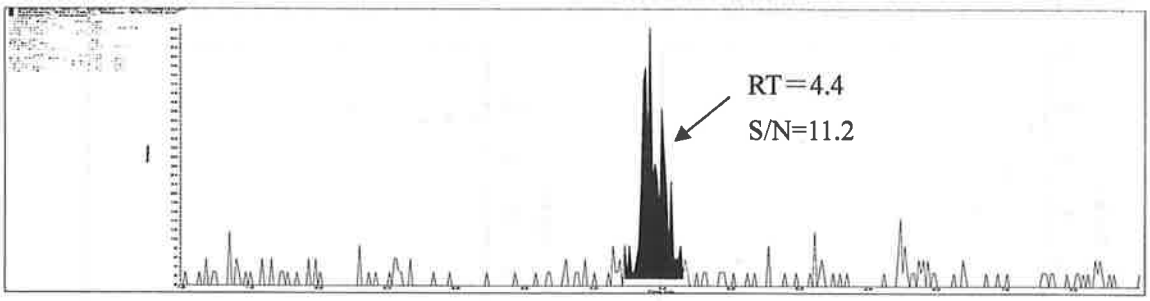


図9　操作ブランクのクロマトグラム

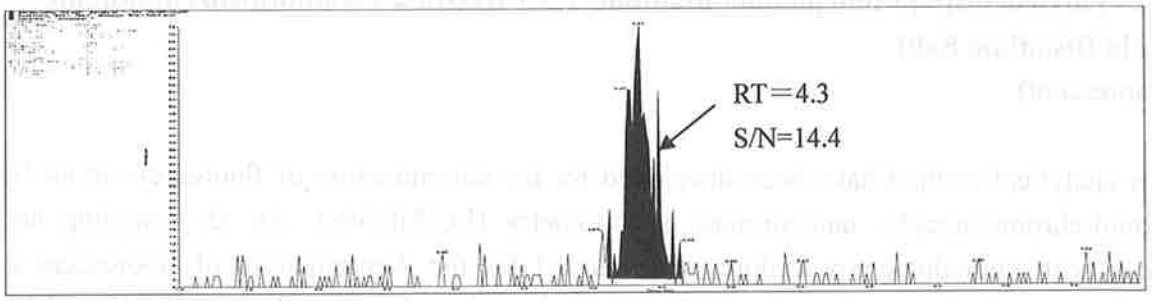


図10　大気試料（無添加）のクロマトグラム

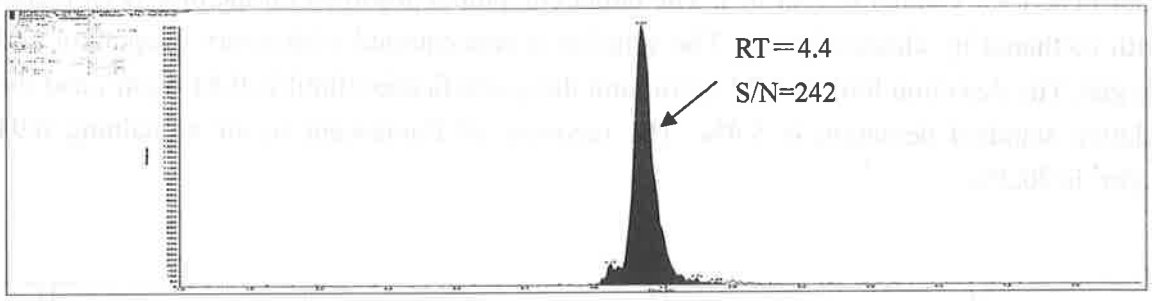


図11　大気試料（標準物質添加）のクロマトグラム（6.94 ng/m^3）

【評価】

本法により、大気中に0.33 ng/m^3 レベルで存在するフルオレスセント260の検出、0.84 ng/m^3 レベルで存在するフルオレスセント 260 の定量が可能である。操作ブランク、無添加の大気試料からピークが検出されたが、下限値未満であった。

【担当者氏名・連絡先】

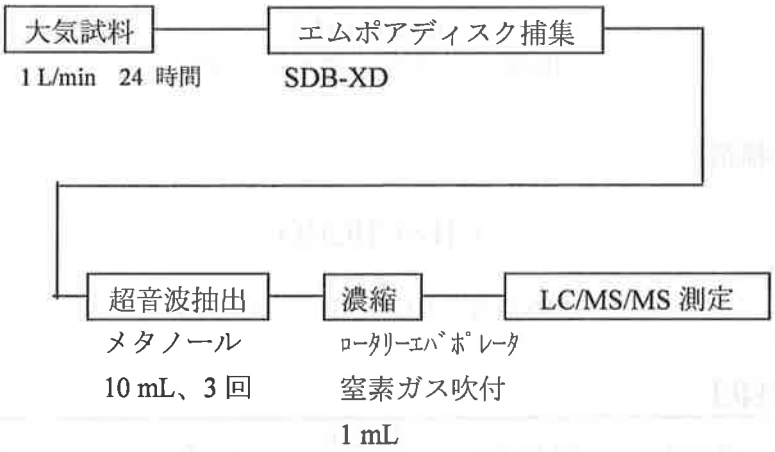
担当　いであ株式会社　環境創造研究所
環境化学グループ
住所　〒421-0212　静岡県志太郡大井川町利右衛門 1334-5
TEL：054-622-9552　FAX：054-622-9522
担当者　山本潤
E-mail：yjun@ideacon.co.jp

2,2'-Vinylenebis[5-(4-morpholino-6-anilino-1,3,5-triazin-2-ylamino)benzenesulfonic Acid Disodium Salt]

(Fluorescent)

An analytical method have been developed for the determination of fluorescent in air by liquid-chromatography tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS). An air sampling and analytical methodology procedure is developed for the determination of fluorescent in environmental air sample using SDB-XD Disk and analyzed with LC/MS/MS (SRM) method. An air sample is passed through an SDB-XD Disk at a flow rate of 1 L/min for 24 hour (The total volume is 1.44 m^3). The target compound absorbed on the disk is extracted with methanol by ultrasonication. The solution is concentrated with rotary evaporator and N_2 gas. The detection limit is 0.33 ng/m^3 and the quantification limit is 0.84 ng/m^3, and the relative standard deviation is 5.4%. The recovery of fluorescent in air containing 6.94 ng/m^3 is 70.3%.

Air sample	Sample collection	Ultrasonic Extraction	Concentration	LC/MS/MS
1 L/min 24 hr	Empore SDB-XD	Methanol 10 mL 3 times	Evaporators N_2 gas	

物質名	分析法フローチャート	備考
ﾌﾙｵﾚｽｾﾝﾄ 260		LC/MS/MS-SRM Mightysil RP-4 GP （4.6×150 mm, 5 μm） 測定方法の検出下限 0.33 ng/m^3