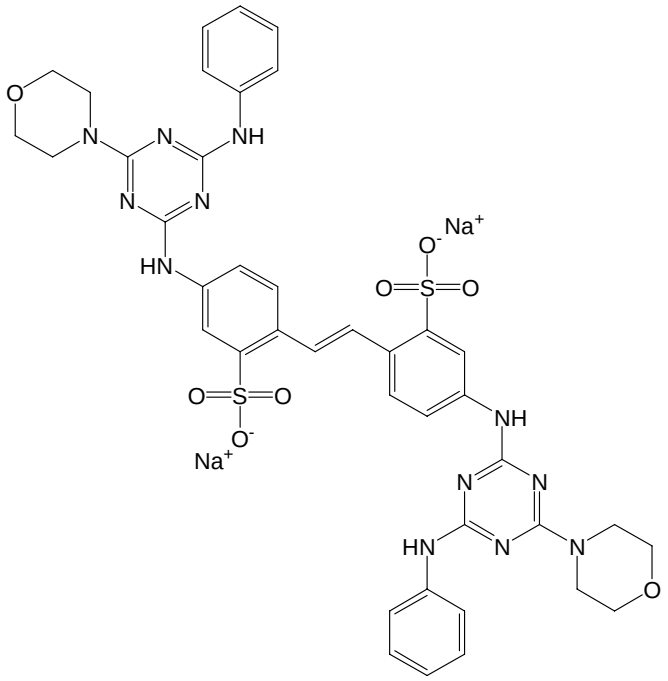
株式会社 島津テクノリサーチ

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]

Disodium-2,2’-vinylenebis[5-4(morpholino-6-anilino-1,3,5-triazin-2-ylamino) benzenesulfonate]

別名：フルオレスセント 260、4,4’-ビス[(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]-2,2’-スチルベンジスルホン酸ジナトリウム
Fluorescent-260、4,4'-Bis((2-anilino-4-morpholino-1,3,5-triazin-6-yl) amino)-2,2'-stilbenedisulfonic acid, disodium salt

【対象物質の構造】



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

【物理化学的性状】

分子量	沸点（℃）	蒸気圧(mmHg)	水溶解度（mg/L）	LogPow
924.9	1188.28 （計算値）[1]	2.25×10^{-38}(25 ℃) （計算値）[1]	5（25 ℃）[2]	1.48 [3]

1) Syracuse Research Corporation (SRC), MPBPWIN v1.42
2) CHEM INSPECT TEST INST (1992)
3) Veith *et al*.(1979)

【毒性、用途】

毒性 [1]	：	20 mg/L（藻類 生長阻害 72 h-EC_{50}） 3.3 mg/L（藻類 生長阻害 72 h-NOEC） >50 mg/L （ミジンコ 急性遊泳阻害 48 h-EC_{50}） 1.3 mg/L （ミジンコ 繁殖阻害 21 day-EC_{50}） 0.42 mg/L（ミジンコ 繁殖阻害 21 day-NOEC） >44 mg/L（魚類 急性毒性 96 h- LC_{50}） 40 mg/L（魚類 延長毒性 14 day-LC_{50}） 14 mg/L （魚類 延長毒性 14 day-NOEC）
用途	：	染料、蛍光増白剤

1)環境省、生態影響試験結果一覧（平成 20 年 3 月版）

§1 分 析 法

(1) 分析法の概要

水試料 100 mL を固相カートリッジに通水してフルオレセント 260 の抽出を行う。この固相カートリッジからメタノールで溶出して濃縮後、内標準物質を添加し、LC/MS-SIM で分析する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

メタノール	：	和光純薬工業製 高速液体クロマトグラフィー用
アセトニトリル	：	関東化学製 高速液体クロマトグラフィー用
酢酸アンモニウム	：	和光純薬工業製　特級
フルオレセント 260	：	Ciba Specialty Chemicals 社製 TINOPAL　AMS-GX
ジウロン-d_6 100ppm	：	Dr.Ehrenstorfer 製

【器具】
固相抽出用カートリッジ ： Waters 製 Sep-Pak Plus PS-2
リザーバー
試験管
吸引マニホールド
真空ポンプ

(3) 分析法

【試料採取及び保存】
環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 18 年 3 月）に従う。

【試料の前処理及び試験液の調製】
試料水 100 mL を、あらかじめメタノール 10 mL 及び精製水 10 mL でコンディショニングした固相カートリッジ Sep-Pak Plus PS-2 に、10 mL/min で通水してフルオレスセント 260 を捕集する。通水後、固相カートリッジを精製水 5 mL で洗浄し、遠心分離（3000 rpm、10 min）で間隙水を除去する。固相カートリッジ内のフルオレスセント 260 をメタノール 6 mL で溶出し、これを試料前処理液とする。試料前処理液を窒素気流下で 1 mL まで濃縮し、内標準液(ジウロン-d_6) を 10.0 ng 添加し試験液とする。

【空試験液の調製】
精製水 100 mL で【試料の前処理及び試験液の調製】の操作を行い、得られた試験液を空試験液とする。

【標準液の調製】
フルオレスセント 260 をメタノールに溶解し 1.00 mg/mL の標準原液を調製する。この標準原液をメタノールで順次希釈し、検量線用標準液を作成する。
内標準（ジウロン-d_6）の標準原液として、ジウロン-d_6 100ppm（Dr.Ehrenstorfer 製）を用いる。この標準原液をメタノールで順次希釈して 1.00 μg/mL の内標準液を調製する。

【測定】

［LC/MS 分析条件］

使用機器

LC機種　：Prominence（島津製作所製）

MS機種　：API 3200（Applied Biosystem製）

LC条件

分析カラム　：Inertsil ODS-3　2.1×50 mm ,3 μm（GLサイエンス製）

HPLC移動相　：A : 2 mM酢酸アンモニウム水溶液

B : アセトニトリル

0→ 1 min	B : 10%
1→ 5 min	B : 10→80%
5→10 min	B : 80%
10→11 min	B : 80→10%
11→16 min	B : 10%

流量　：0.2 mL/min

カラム温度　：40 ℃

注入量　：5 μL

MS条件（注1）

イオン化法　：ESI（Negative SIM）

Curtain Gas　：10 psi

IonSpray Voltage　：-4500 V

Temperature　：600 ℃

Ion Source Gas 1　：50 psi

Ion Source Gas 2　：80 psi

モニターイオン　フルオレスセント 260　：879.3（定量用）

：799.3（確認用）

ジウロン-d_6　：237.0

［検量線］

フルオレセント 260 標準原液（1.00 mg/mL）をメタノールで希釈し、0.5～50 ng/mL の範囲にわたる 5 種類以上の濃度で検量線用標準液を作成する。各濃度の標準液には10.0 ng/mL の濃度になるように内標準物質を添加する。

検量線用標準液 5 μL を LC/MS に導入して分析する。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内標準物質のピーク面積で割って得られる比を計算し、検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準液に含まれる標準物質の濃度を内標準物質の濃度で割って得られる比を計算し、

検量線の横軸とする。最小二乗法により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］

試験液 5 μL を LC/MS に導入して分析する。得られた被検物質のピーク面積を内標準物質のピーク面積で割った比から、検量線を基にして、被検物質濃度を内標準濃度で割った比（R）を求める。

［濃度の算出］

試料中濃度 C (ng/L）は次式により計算する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R ： 検量線から求めた被検物質濃度を内標準物質濃度で割った比
Q ： 試料中に添加した内標準の量（ng）
V ： 試料水量（L）

［装置検出下限値（IDL)］

本分析に用いた LC/MS の IDL を以下に示す（注 2)。

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
フルオレスセント 260	0.19	0.100	1	1.9

［測定方法の検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL)］

本分析法の MDL 及び MQL を以下に示す（注 3)。

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	検出下限値 (ng/L)	定量下限値 (ng/L)
フルオレスセント 260	0.100	1	2.9	7.5

注　解

（注 1）フルオレスセント 260 のモニターイオン(*m/z* 879.3)には、測定に適したプロダクトイオンが無かったため、LC/MS(SIM)法を採用した。

（注 2）装置検出下限値（IDL）は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 18 年 3 月）に従い、表 1 のとおり算出した。

表 1　装置検出下限値（IDL）の算出

物質名	フルオレスセント260
試料量 (L)	0.100
最終液量 (mL)	1
注入液濃度 (ng/mL)	1.00
装置注入量 (μL)	5
結果1 (ng/mL)	1.05
結果2 (ng/mL)	0.931
結果3 (ng/mL)	0.975
結果4 (ng/mL)	0.952
結果5 (ng/mL)	0.941
結果6 (ng/mL)	0.976
結果7 (ng/mL)	0.897
平均値 (ng/mL)	0.9603
標準偏差 (ng/mL)	0.048
IDL (ng/mL)	0.19
IDL試料換算値 (ng/L)	1.9
S/N比	11
CV (%)	5.0

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

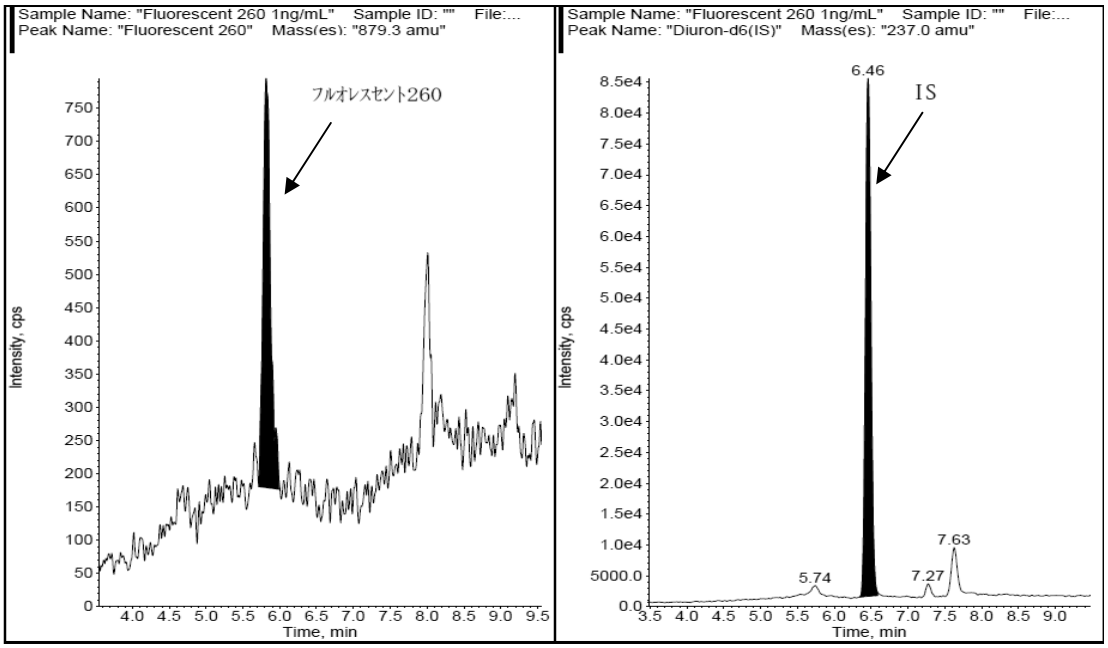


図 1　IDL のクロマトグラム

（注 2）分析法の検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL）は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 18 年 3 月）に従い、表 2 のとおり算出した。

表 2　分析法の検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL）

物質名	フルオレスセント260
試料	河川水
試料量 (L)	0.100
標準添加量 (ng)	0.500
試料換算濃度 (ng/L)	5.00
最終液量 (mL)	1
注入液濃度 (ng/mL)	12.7
装置注入量 (μL)	5
操作ブランク平均 (ng/L)①	ND
無添加平均 (ng/L)②	7.24
結果1 (ng/L)	11.4
結果2 (ng/L)	12.2
結果3 (ng/L)	13.2
結果4 (ng/L)	11.8
結果5 (ng/L)	11.7
結果6 (ng/L)	12.9
結果7 (ng/L)	13.2
平均値 (ng/L)	12.34
標準偏差 (ng/L)	0.75
MDL (ng/L)	2.9
MQL (ng/L)	7.5
S/N比	11
CV (%)	6.1

※ MDL(ng/L)=t(n-1, 0.05)× σ_{n-1} ×2

※ MQL(ng/L)= σ_{n-1} ×10

① 操作ブランク平均：試料マトリックスのみが無い状態で他は同様の操作を行い、測定した値の平均値

② 無添加平均：MDL 算出用試料に標準品を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

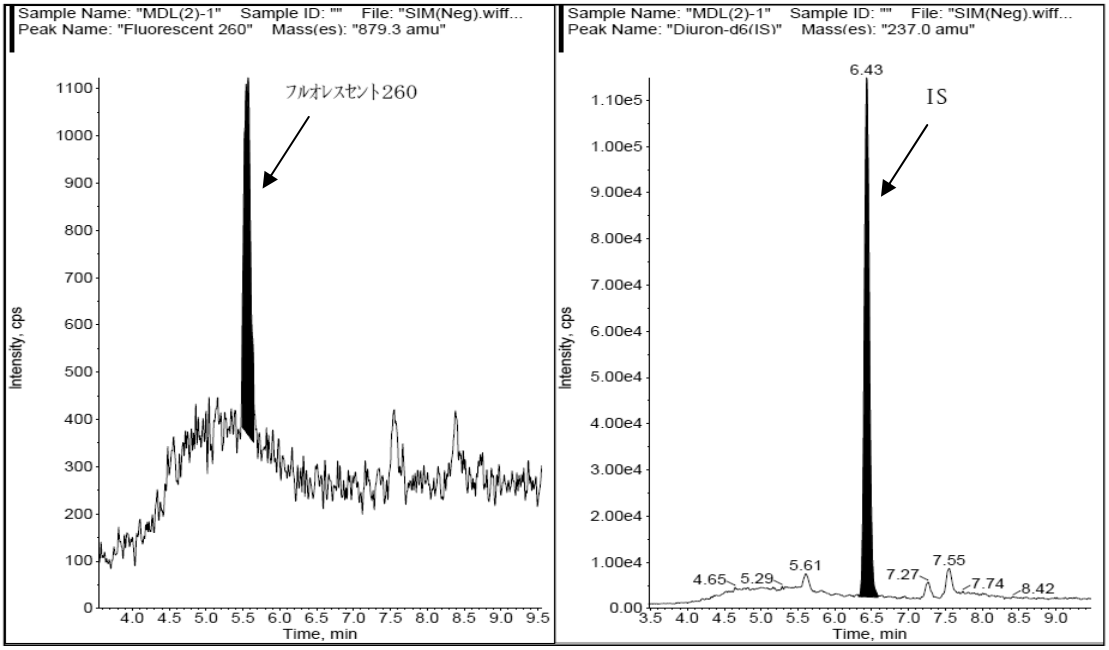


図 2　MDL のクロマトグラム

§2　解説

【分析法】

［フローチャート］

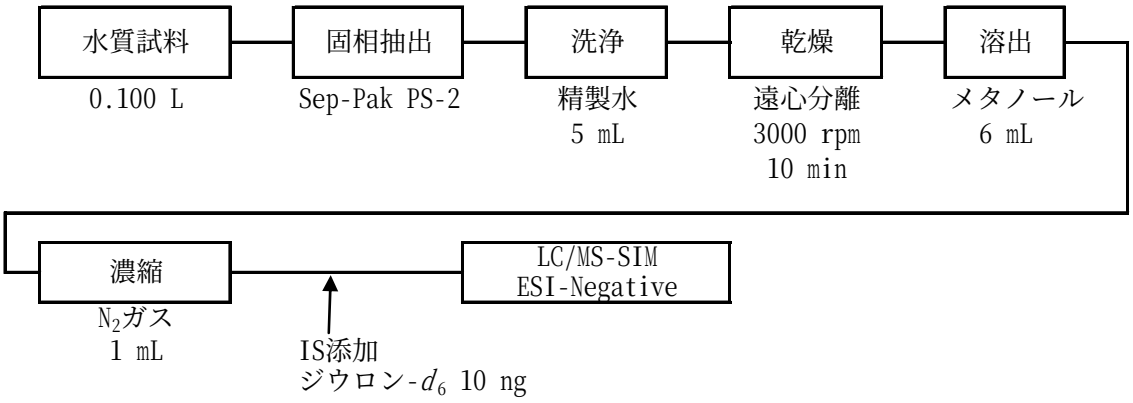


図 3 分析法フローチャート

［検量線］

r^2=0.999 以上の良好な直線性であった。検量線を以下に示す。

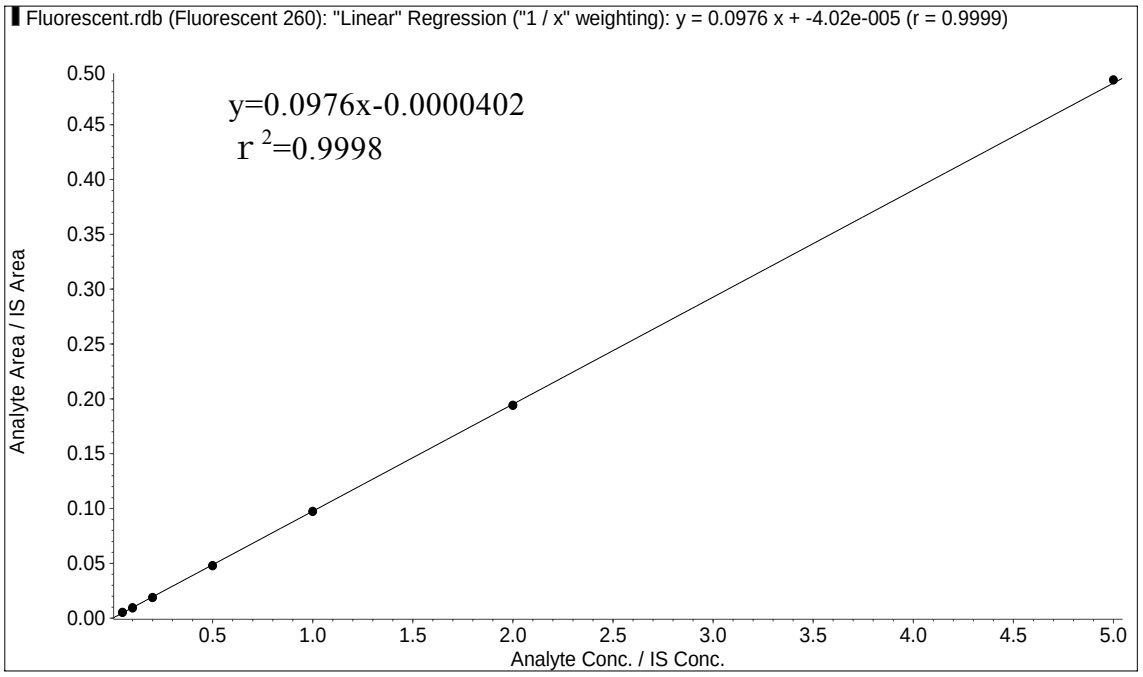


図 4 検量線（内標準物質 10.0 ng/mL、対象物質濃度範囲 0.500～50.0 ng/mL）

表 3　検量線作成に用いたデータ

試料名	面積値	IS 面積値	比（面積値/IS 面積値）	計算濃度	%偏差
0.5 ng/mL	2238	424253	0.005276	0.545	8.9
1 ng/mL	4114	437255	0.009408	0.968	-3.2
2 ng/mL	8210	437162	0.01878	1.93	-3.6
5 ng/mL	20136	421346	0.04779	4.90	-2.0
10 ng/mL	42116	432661	0.09734	9.98	-0.22
20 ng/mL	82445	424829	0.1941	19.9	-0.56
50 ng/mL	211554	431074	0.4908	50.3	0.58

［標準物質のマススペクトル］

フルオレスセント 260 のマススペクトルを以下に示す。

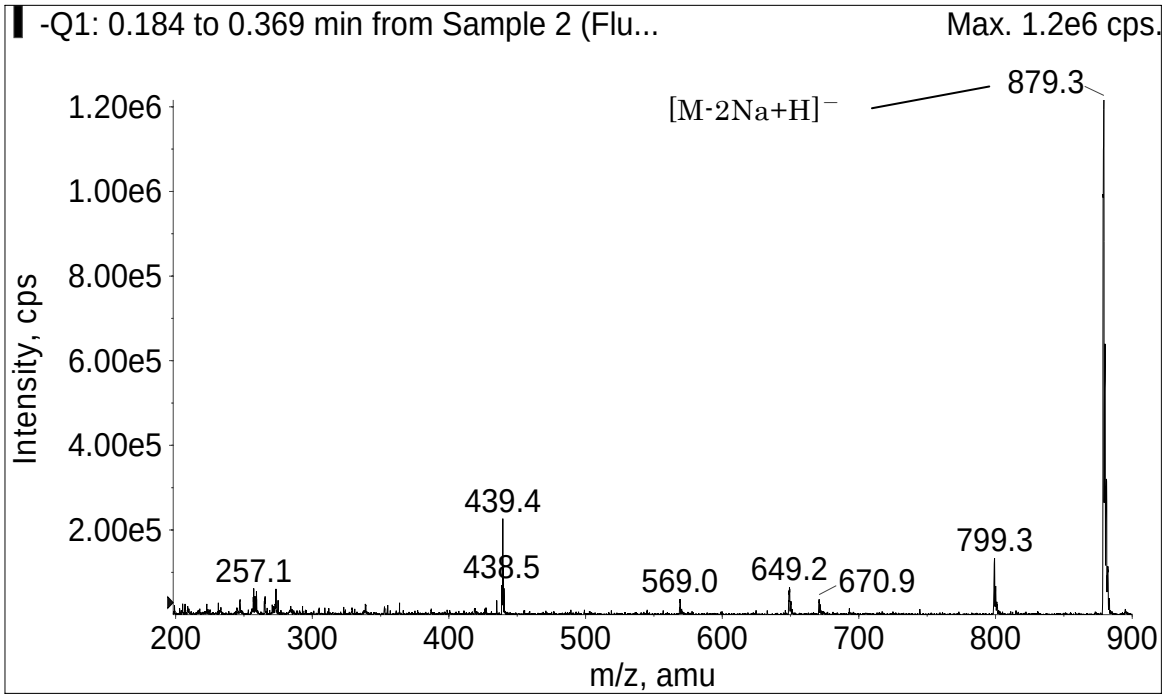


図 5 フルオレスセント 260 マススペクトル

［操作ブランク］

精製水 100 mL を使用して、【試料の前処理及び試験液の調製】の処理を行い、操作ブランクの確認を行ったところ、フルオレスセント 260 は検出されなかった。

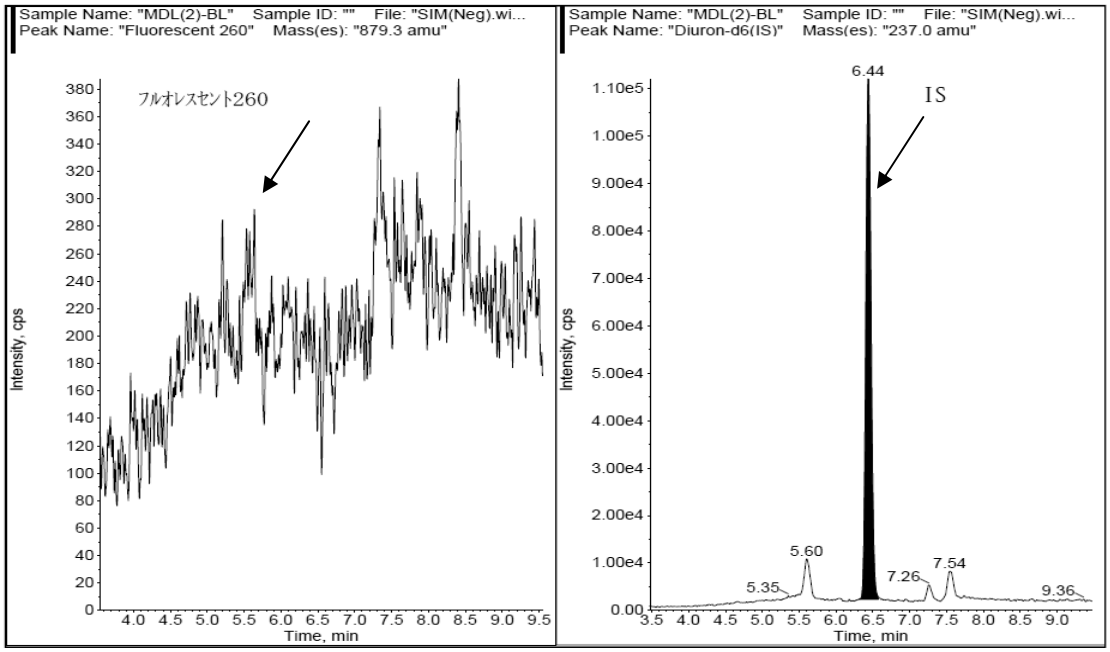


図 6　操作ブランクのクロマトグラム

［添加回収試験結果］

河川水、海水へ標準物質を添加して【試料の前処理及び試験液の調製】の処理を行い、無添加試料の結果を差し引いて回収率を算出した。以下に添加回収試験結果を示す。

表 4　添加回収試験結果

試料名	試料量 (L)	標準添加量 (ng)	測定回数	検出濃度（ng/L）	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	0.100	無添加	1	78.8	-	-
	0.100	12	5	191	94	5.2
海水	0.100	無添加	1	41.7		
	0.100	15	5	165	82	2.8

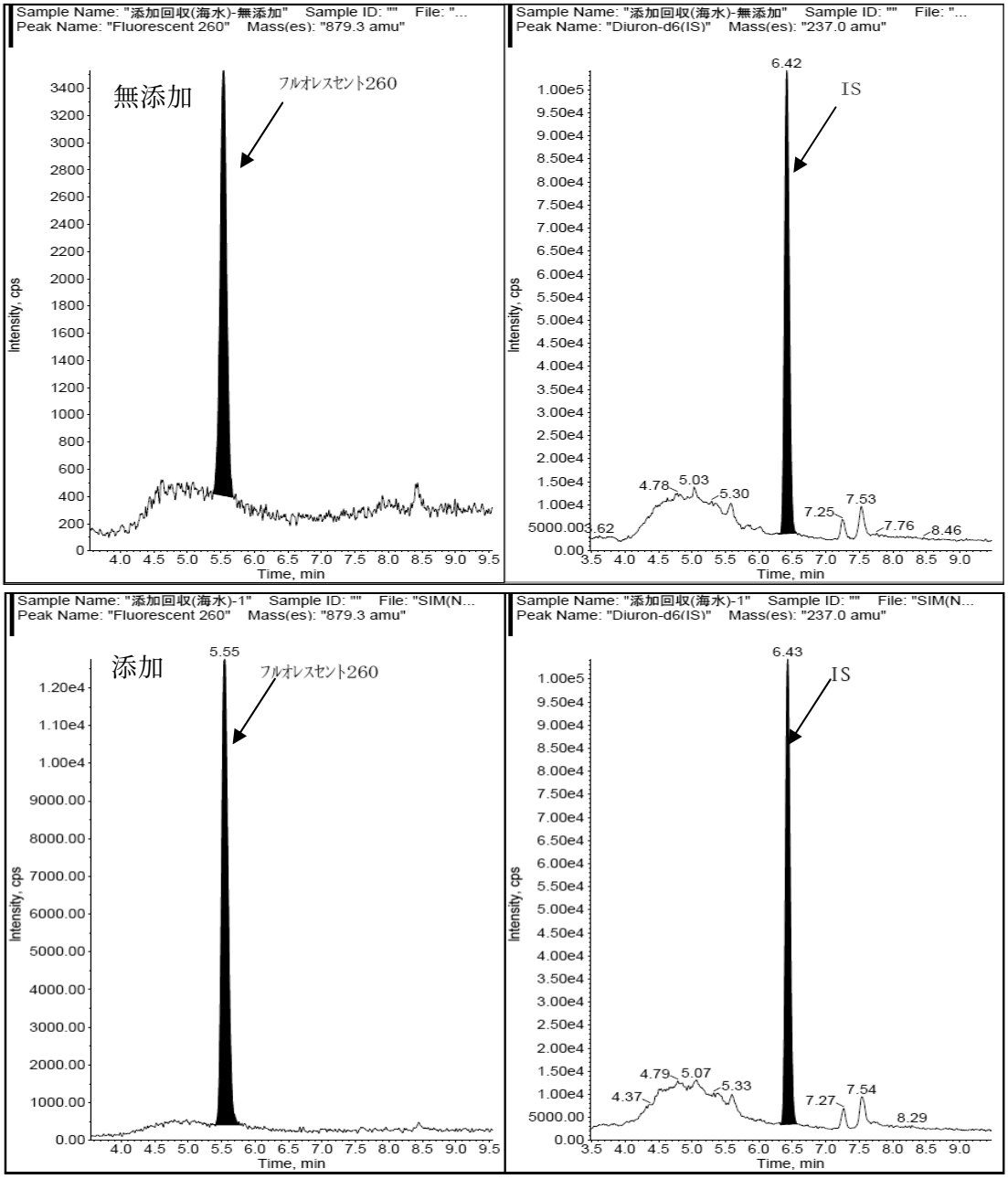


図 7　添加回収試験（海水）のクロマトグラム

［分解性スクリーニング試験］

精製水の pH を調製し、設定濃度が 100 ng/L になるように標準物質を添加して、分解性スクリーニング試験を行った。その結果を以下に示す。

表 5　分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 (ng/L)	1 時間放置後の残存率(%)	5 日間放置後の残存率(%)	
			暗所	明所
5	87.3	97	98	-
7	87.2	99	98	92
9	96.4	93	99	-

［保存性試験］

河川水に、設定濃度が 100 ng/L になるように標準物質を添加して、保存性試験を行った。その結果を以下に示す。

表 6　保存性試験結果

試料名		初期濃度 (ng/L)	残存率（%）				
			1 日間	2 日間	5 日間	15 日間	30 日間
河川水	試料	97	98	91	106	102	112
	抽出液	97	-	-	96	100	97

［環境試料の分析］

京都、大阪府内の 5 ヶ所の河川水を分析したところ、7.2～380 ng/L のフルオレスセント 260 が検出された。

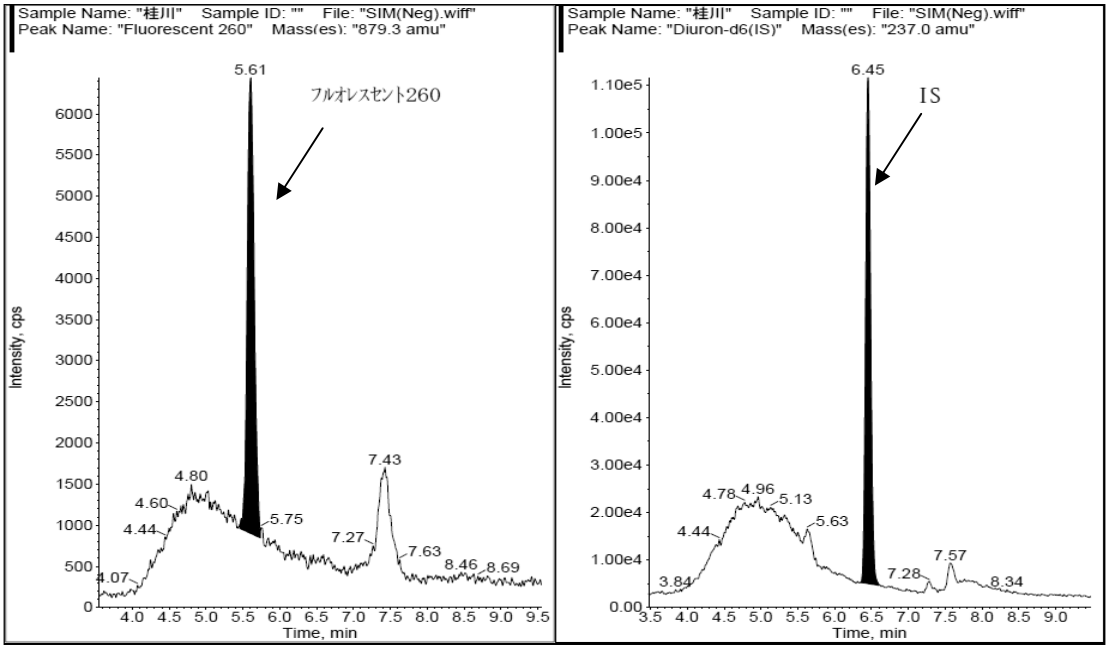


図 8　河川水（京都市）のクロマトグラム

【評価】

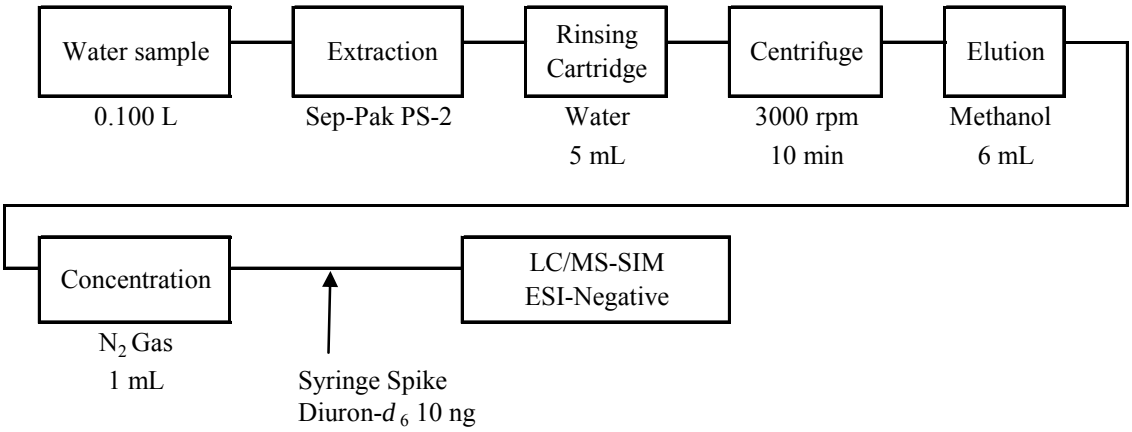
本法は、環境水中のジナトリウム=2,2'-ビニレンビス[5-(4-モルホリノ-6-アニリノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノ)ベンゼンスルホナート](別名：フルオレスセント 260)の MDL が 2.9 ng/L、MQL が 7.5 ng/L であり、河川水と海水を用いた添加回収試験では、河川水が 87～100%（変動係数 5.2%)、海水では 80～86%（変動係数 2.8%）の回収率であった。また、京都、大阪府内の河川水について測定を行ったところ、7.2～380 ng/L の濃度で検出された。これらのことから、本法は環境水中のフルオレスセント 260 の定量分析（要求感度 420 ng/L）に適用できる。

【担当者氏名・連絡先】

担当：株式会社島津テクノリサーチ
住所：〒604-8435　京都市中京区西ノ京三条坊町 2 番地の 13
TEL：075-811-3182　　FAX：075-811-3278
担当者：中村明広
E-mail：a_nakamura00@shimadzu-techno.co.jp

Disodium-2,2'-vinylenebis[5-4(morpholino-6-anilino-1,3,5-triazin-2-ylamino) benzenesulfonate] (Fluorescent 260)

This method provides procedures for the determination of fluorescent 260 in water sample by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The analyte is extracted using a solid phase extraction cartridge (Waters Sep-Pak PS-2). The cartridge is preconditioned with 10 mL of methanol and 10 mL of water. A water sample (0.1 L) is passed through the cartridge at a flow rate of 10 mL/min. The extract in the cartridge is rinsed with 5 mL of water and eluted with 6 mL of methanol. The eluate is concentrated to 1 mL under gentle nitrogen stream. After spike of diuron-d_6 as an internal standard, the analyte is determined by LC/MS. Ionization mode is negative ESI (electrospray ionization). The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) is 2.9 and 7.5 ng/L, respectively. The average of recoveries (n=5) from 12 ng fluorescent 260 added surface water from river was 94%, and the relative standard derivation was 5.2%.



物質名	分析法フローチャート	備　考
ｼﾞﾅﾄﾘｳﾑ=2,2'-ﾋﾞﾆﾚﾝﾋﾞｽ[5-(4-ﾓﾙﾎﾘﾉ-6-ｱﾆﾘﾉ-1,3,5-ﾄﾘｱｼﾞﾝ-2-ｲﾙｱﾐﾉ)ﾍﾞﾝｾﾞﾝｽﾙﾎﾅｰﾄ 別名：ﾌﾙｵﾚｽｾﾝﾄ260、4,4'-ﾋﾞｽ[(4-ﾓﾙﾎﾘﾉ-6-ｱﾆﾘﾉ-1,3,5-ﾄﾘｱｼﾞﾝ-2-ｲﾙ)ｱﾐﾉ]-2,2'-ｽﾁﾙﾍﾞﾝｼﾞｽﾙﾎﾝ酸ｼﾞﾅﾄﾘｳﾑ	【水質】 水質試料 (0.100 L) → 固相抽出 (Sep-Pak Plus PS-2) → 洗浄 (精製水) → 乾燥 (遠心分離 3000 rpm 10 min) → 溶出 (メタノール) → 濃縮 (窒素パージ) → LC/MS-SIM-ESI-Negative ↑ 内標準物質添加 Diuron-d_6 10 ng	分析原理： LC/MS-SIM-ESI-Negative 検出下限値： 【水質】(ng/L) 2.9 分析条件： 機器 LC：Prominennce MS：API-3200 カラム Inertsil ODS-3 2.1 mm×50 mm, 3 µm