

o-クロロアニリン

2-Chloroaniline

IUPAC 名：1-アミノ-2-クロロベンゼン

1-Amino-2-chlorobenzene

別名：2-クロロ-1-アミノベンゼン

2-Chloro-1-aminobenzene

2-クロロベンゼンアミン

2-Chlorobenzenamine

2-クロロフェニルアミン

2-Chlorophenylamine

m-クロロアニリン

3-Chloroaniline

1-アミノ-3-クロロベンゼン

1-Amino-3-chlorobenzene

3-クロロ-1-アミノベンゼン

3-Chloro-1-aminobenzene

3-クロロベンゼンアミン

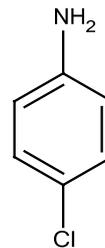
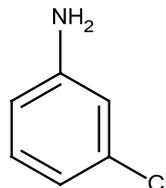
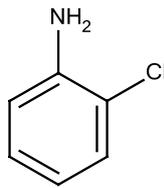
3-Chlorobenzenamine

3-クロロフェニルアミン

3-Chlorophenylamine

*本分析法では、異性体である *p*-クロロアニリンも測定対象とする。

【対象物質の構造】



o-クロロアニリン
(2-クロロアニリン)

m-クロロアニリン
(3-クロロアニリン)

p-クロロアニリン
(4-クロロアニリン)

CAS番号： 95-51-2

108-42-9

106-47-8

分子式： C₆H₆ClN

C₆H₆ClN

C₆H₆ClN

【物理化学的性状】

項目	<i>o</i> -クロロアニリン	<i>m</i> -クロロアニリン	<i>p</i> -クロロアニリン
分子量	127.57	127.57	127.57
モル質量	127.0188	127.0188	127.0188
融点 ¹⁾	-1.94°C	-10.4°C	72.5°C
沸点 ¹⁾	208.84°C(decomposition)	230.5°C	232°C
比重 ¹⁾	1.2114 (<i>d</i> ₄ ²⁰)*	1.2150 (<i>d</i> ₄ ²⁰)*	1.169(<i>d</i> ₄ ²⁰)*
蒸気圧 ²⁾	0.034 kPa (25°C)	0.0156 kPa (25°C)	0.027 kPa (25°C)
対水溶解度 ²⁾	8.76 g/L (25°C)	5.44 g/L (25°C)	2.75 g/L(25°C)
log P _{ow} ³⁾	1.90	1.88	1.83

*4°C における水の密度と 20°C における当該物質の密度との比

- 1) Maryadele J. O'Neil(Ed), The Merck Index 14th Edition
- 2) Lide, D.R,(ed), CRC Handbook of Chemistry and Physics 88th Edition
- 3) PRTR 排出量等算出マニュアル 第3版

【毒性、用途等】

〔毒性〕

o-クロロアニリン

(急性毒性) 経口：LD₅₀: 256 mg/kg (マウス)、1016 mg/kg (ラット)
吸入：LC₅₀: 4100-6000 mg/m³ (ラット 4時間)
経皮：LD₅₀: 1000 mg/kg (ラット)、>200 mg/kg (ウサギ)、222 mg/kg (ネコ)

m-クロロアニリン

(急性毒性) 経口：LD₅₀：334 mg/kg (マウス)、256 mg/kg (ラット)
250 mg/kg (モルモット)
経皮：LD₅₀：223 mg/kg (ネコ)
静脈内注射：LD_{L0}: 50 mg/kg (イヌ)
皮下注射：LD_{L0}: 125 mg/kg (ネコ)

p-クロロアニリン

(急性毒性) 経口：LD₅₀：228 - 500 mg/kg (マウス)、300 - 425 mg/kg (ラット)
吸入：LC₅₀：442 ppm (ラット 4時間)
経皮：LD₅₀：約 300 mg/L (ラット、ウサギ、ネコ)

〔用途〕

o-クロロアニリン：医薬・農薬中間原料，樹脂架橋剤

m-クロロアニリン：染料中間体

p-クロロアニリン：染料中間体，医薬原料，農薬原料，樹脂架橋剤

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水試料に内標準物質(サロゲート)を添加し、固相カートリッジ(Oasis HLB)に通水してクロロアニリンを抽出する。Oasis HLB の下段に固相抽出管(Oasis MCX)を連結し、上段の Oasis HLB からメタノールで溶出したクロロアニリンを、下段の Oasis MCX に吸着させる。Oasis HLB を取り外し、Oasis MCX に 0.1%アンモニア/90%メタノール溶液を通液し、クロロアニリンを溶出する。これを LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive) 法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

- ・ *o*-クロロアニリン : 関東化学製、鹿特級 (>98.0%)
- ・ *m*-クロロアニリン : ACROS ORGANICS(ACR)製、(99%)
- ・ *p*-クロロアニリン : 関東化学製、鹿特級 (>98.0%)
- ・ 2-クロロアニリン-4,6-*d*₂ : C/D/N Isotopes,INC.(CDN)製、(98%)
- ・ 3-クロロアニリン-2,4,6-*d*₃ : C/D/N Isotopes,INC.(CDN)製、(98%)
- ・ 4-クロロアニリン-2,3,5,6-*d*₄ : C/D/N Isotopes,INC.(CDN)製、(98%)
- ・ メタノール : 関東化学製、LC/MS 用 (>99.8%)
- ・ アセトン : 残留農薬試験・PCB 試験用(300 倍濃縮)
- ・ ギ酸 : 和光純薬工業製、試薬特級(99%)
- ・ 25%アンモニア水 : 和光純薬工業製、試薬特級(25 ~ 27.9%)
- ・ 0.1%アンモニア/90%メタノール溶液 : 25%アンモニア水 0.4 mL、メタノール 90 mL に精製水を加えて 100 mL とする。
- ・ 精製水 : ミリQ水(JIS K 0557(1998)に規定される種別 A4 と同等以上の質のもの)
- ・ 固相カートリッジ : Oasis HLB Plus type 225 mg (Waters 製)
- ・ 固相抽出管 : Oasis MCX 30 mg/1 mL (粒子径 60 μm) (Waters 製) (注 1)

【標準液の調製】

〔標準原液〕

2-クロロアニリン 500 mg を精秤し、メタノール 100 mL に溶解して 5.00 mg/mL の標準原液を調製する。3-クロロアニリン、4-クロロアニリンについても同様に調製する。

〔内標準液〕

2-クロロアニリン-*d*₂ を 100 mg 精秤し、メタノール 100 mL に溶解して 1.00 mg/mL の内標準原液を調製する。3-クロロアニリン-*d*₃、4-クロロアニリン-*d*₄ についても同様に調製する。

内標準原液をメタノールで希釈する。希釈段階の途中で 3 異性体の調製液を混合して、2-クロロアニリン-*d*₂ は 2000 ng/mL、3-クロロアニリン-*d*₃、4-クロロアニリン-*d*₄ は各 200 ng/mL の混合内標準液を作成する。

〔検量線用標準液〕

各標準原液をメタノールで順次希釈し、希釈段階の途中で 3 異性体の標準液を混合する。希釈の最後の段階では 25%アンモニア水と精製水を加え 0.1%アンモニア/90%メタノール溶液として、検量線用標準液を用事調製する(注 2)。検量線用標準液の各濃度は、2-クロロアニリンで 2.00 ~ 100 ng/mL の範囲、3-クロロ

アニリン、4-クロロアニリンで 0.200 ~ 10.0 ng/mL の範囲とする。また、高濃度検量線用標準液として、2-クロロアニリンで 5000 ng/mL まで、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンで 500 ng/mL の範囲までの検量線用標準液を用事調製する(注2)。各濃度の検量線用標準液には、内標準を 2-クロロアニリン- d_2 で 100 ng/mL、3-クロロアニリン- d_3 、4-クロロアニリン- d_4 で 10.0 ng/mL になるように添加する。

【器具】

- ・メスシリンダー、メスフラスコ、ピペット類、マイクロシリンジ、100 mL 比色管、ガラス製注射筒(10 mL)
- ・GL-SPE 濃縮管 1.0 & 2.0 & 5.0 メス/6 mL : GL サイエンス製
- ・Sep-Pak コンセントレーター : Waters 製
- ・Sep-Pak ジョイントアダプター(1,3,6cc 用) : Waters 製

(3) 分析法

【試料の採取及び採取試料の前処理】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従う。試料採取後は、すみやかに【試験液の調製】を行うこと。(注3)

【試験液の調製】

水試料 100 mL に内標準液を 100 μ L 添加し、あらかじめコンディショニングをした固相カートリッジ(Oasis HLB: 注4)に、10 mL/min の流速で通水する。試料の入っていた容器は精製水で 10 mL \times 1 回、20 mL \times 1 回洗浄し、洗液も通水する。通水後、固相に注射筒で空気を通気して間隙水を除去し、コンディショニングをした固相抽出管(Oasis MCX: 注5)を、アダプターを介して下段に連結する。上段の Oasis HLB からメタノール 6 mL で溶出したクロロアニリンを、下段の Oasis MCX に吸着させる。Oasis HLB を取り外し、Oasis MCX に注射筒で空気を通気して固相の間隙に残っているメタノールを除去する。0.1%アンモニア/90%メタノール溶液(注6)を受け器の濃縮管 2.0 mL 標線まで通液しクロロアニリンを溶出して、これを試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS 条件〕

LC

使用機器 : Waters Alliance 2695

カラム : SUPELCO Ascentis RP-Amide (2.1 mm \times 150 mm \times 3 μ m)

移動相 : A : 精製水 B : メタノール C : 3%ギ酸溶液
 0.0 min A : B : C = 50 : 40 : 10
 0.0 min 6.0 min B : 40 90 linear gradient
 (A : 50% 0% C : Fixed)
 6.0 min 10.0 min A : B : C = 0 : 90 : 10
 (Return to initial conditions)
 10.0 min → 20.0 min A : B : C = 0 : 90 : 10
 20.0 min → 30.0 min A : B : C = 50 : 40 : 10
 カラム流量 : 0.0 min 10.0 min 0.2 mL/min
 10.0 min → 30.0 min 0.3 mL/min
 カラム温度 : 40°C
 試料注入量 : 5 μL

MS

使用機器 : Waters Quattro micro API
 キャピラリー電圧 : 0.5 kV
 コーン電圧 : 35 V
 コリジョンエネルギー : 18 eV
 ソース温度 : 120°C
 デゾルベーション温度 : 450°C
 コーンガス : N₂ 50 L/hr
 デゾルベーションガス : N₂ 700 L/hr
 イオン化法 : ESI (+)
 測定モード : SRM

モニターイオン

物質名	定量用(m/z)	確認用(m/z)
2-クロロアニリン	128.1 > 92.1	128.1 > 65.0
2-クロロアニリン-d ₂	130.1 > 94.0	-
3-クロロアニリン	128.1 > 93.1	128.1 > 111.0
3-クロロアニリン-d ₃	131.1 > 96.0	-
4-クロロアニリン	128.1 > 93.1	128.1 > 111.0
4-クロロアニリン-d ₄	132.1 > 97.0	-

〔検量線〕

5種類以上の検量線用標準液 5 μL を LC/MS/MS に導入して分析する。内標準物質のみを添加した溶媒ブランク試験液からは対象物質のピークが検出されないことを確認する(検量線の計算には使用しない)。得られた対象物質と内標準物質のピーク面積比から検量線を作成する。寄与率が 0.995 以上であることを確

認する。各測定点における計算濃度と、実際に添加した濃度との%偏差が±15%以下であることを確認する。

〔定量〕

試験液 5 μL を LC/MS/MS に導入して分析する。得られた対象物質と内標準物質のピーク面積比から、検量線を基にして、対象物質濃度と内標準物質濃度の比(R)を求める。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C (ng/L) は次式により算出する。

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

R : 検量線から求めた 対象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)

(= 添加する内標準の濃度(ng/μL) × 添加する内標準の容量(μL))

V : 試料水量(L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

2-クロロアニリン

$$Q = 200 \text{ (ng)} \text{ (= 添加する内標準の濃度(2.00 ng/μL)} \\ \times \text{添加する内標準の容量(100 μL))}$$

$$V = 0.100 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 2000 \text{ (ng/L)}$$

である。

3-クロロアニリン、4-クロロアニリン

$$Q = 20.0 \text{ (ng)} \text{ (= 添加する内標準の濃度 (0.200 ng/μL)} \\ \times \text{添加する内標準の容量 (100 μL))}$$

$$V = 0.100 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 200 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を次に示す。(注 7)

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
2-クロロアニリン	0.61	0.100	2.0	12
3-クロロアニリン	0.073	0.100	2.0	1.5
4-クロロアニリン	0.060	0.100	2.0	1.2

〔測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)〕

本測定方法における MDL 及び MQL を次に示す(注 8)

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
2-クロロアニリン	0.100	2.0	20	52
3-クロロアニリン	0.100	2.0	1.9	4.9
4-クロロアニリン	0.100	2.0	1.8	4.7

注 解

(注 1) 固相抽出管(Oasis MCX 30 mg/1 mL)は、充填剤の粒子径が違うもの(30 μm)がある。粒子径 30 μm のものを使用した場合、本分析法で指定した溶出溶媒量では、十分な溶出ができないので注意すること。

(注 2) アンモニア濃度により LC/MS 測定時の感度の変動するので、用事調製とする。

表 3 LC/MS 注入試料のアンモニア濃度による応答値の影響
(90%メタノール溶液の応答値を 100 としたときの割合 (%))

物質名	0.1%NH ₃	1%NH ₃
	/90%MeOH	/90%MeOH
2-クロロアニリン	97	73
3-クロロアニリン	90	46
4-クロロアニリン	68	21

(注 3) 環境水試料の保存性試験で濃度低下が認められたため、採水後 4 日以内

に【試験液の調製】の操作を行うこと。試験液の状態では、7日後でも濃度低下は認められない。

- (注4) 固相カートリッジはアセトン 10 mL、メタノール 5 mL と精製水 20 mL でコンディショニングしたものを使用する。
- (注5) 固相抽出管はアセトン 2 mL、2%ギ酸溶液 2 mL でコンディショニングしたものを使用する。
- (注6) アンモニア濃度が低下すると、Oasis MCX からの溶出が不十分となり回収率が低下するので、用事調製とする。
- (注7) IDL は環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って、表 4 のとおり算出した。IDL 測定時のクロマトグラムを図 1-1 ~ 図 1-3 に示す。

表 4 IDL の算出結果

対象物質名	2-クロロアニリン	3-クロロアニリン	4-クロロアニリン
試料量 (L)	0.100	0.100	0.100
最終液量 (mL)	2.0	2.0	2.0
注入液濃度 (ng/mL)	2.00	0.200	0.200
装置注入量 (μL)	5	5	5
結果 1 (ng/mL)	2.16	0.211	0.200
結果 2 (ng/mL)	2.22	0.188	0.199
結果 3 (ng/mL)	2.05	0.239	0.212
結果 4 (ng/mL)	2.02	0.219	0.214
結果 5 (ng/mL)	2.21	0.194	0.208
結果 6 (ng/mL)	1.76	0.231	0.197
結果 7 (ng/mL)	2.13	0.204	0.168
平均値 (ng/mL)	2.079	0.2123	0.1996
標準偏差 (ng/mL)	0.156	0.0188	0.0153
IDL (ng/mL)*	0.61	0.073	0.060
IDL 試料換算値 (ng/L)	12	1.5	1.2
S/N 比	14	9.2	12
CV (%)	7.5	8.9	7.7

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

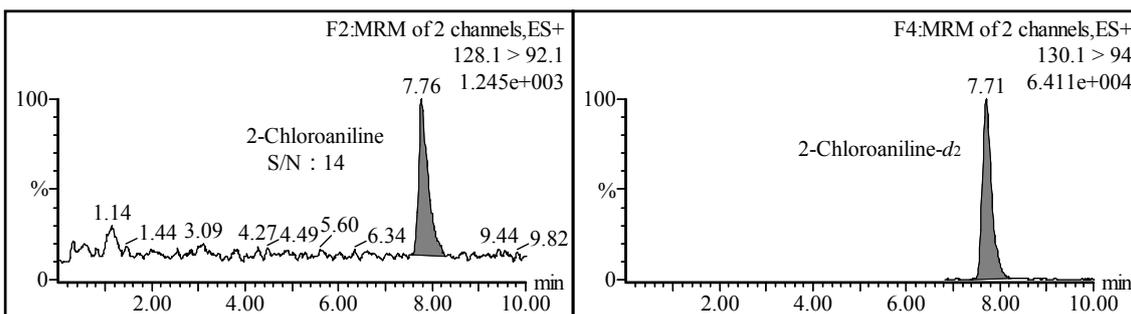


図 1-1 2-クロロアニリンのIDL 算出時のクロマトグラム(2.00 ng/mL 標準液)

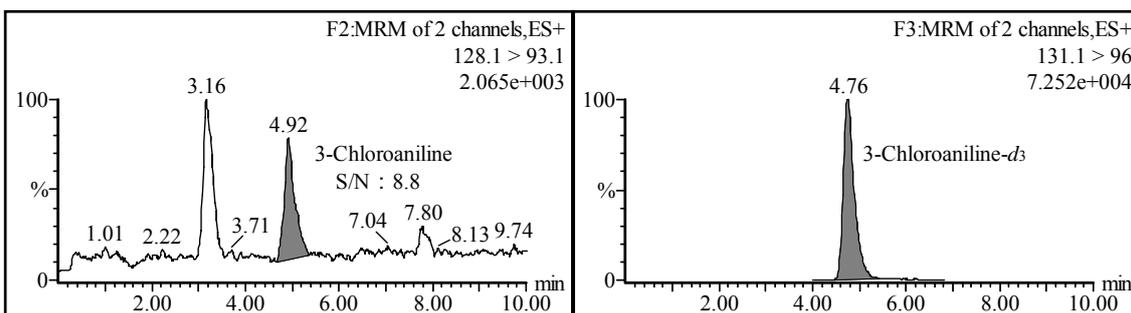


図 1-2 3-クロロアニリンのIDL 算出時のクロマトグラム(0.200 ng/mL 標準液)

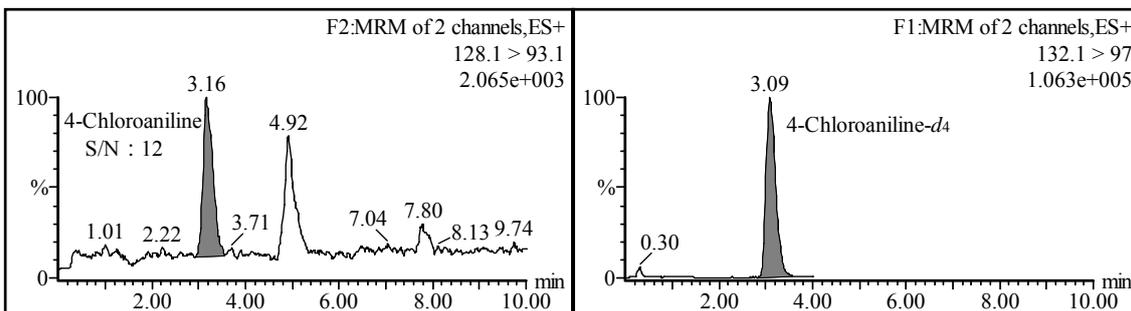


図 1-3 4-クロロアニリンのIDL 算出時のクロマトグラム(0.200 ng/mL 標準液)

(注 8) MDL 及び MQL は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って表 5 のとおり算出した。MDL 及び MQL 測定時のクロマトグラムを図 2-1 ~ 図 2-3 に示す。また、確認用イオンのクロマトグラムを図 3-1 ~ 図 3-3 に示す。

表 5 MDL 及び MQL の算出結果

対象物質名	2-クロロアニリン		3-クロロアニリン		4-クロロアニリン	
試料	河川水		河川水		河川水	
試料量 (L)	0.100		0.100		0.100	
標準添加量(ng)	10.0		1.00		1.00	
試料換算濃度(ng/L)	100		10.0		10.0	
最終液量 (mL)	2.0		2.0		2.0	
注入液濃度	5.00		0.500		0.500	
装置注入量 (μL)	5		5		5	
操作ブランク	ND		ND		tr ^{*6}	
平均 (ng/L) ^{*1}	(91) ^{*5}		(96)		(96)	
無添加平均(ng/L) ^{*2}	ND		ND		tr ^{*6}	
結果 1 (ng/L)	100.0	(94)	9.48	(97)	9.86	(101)
結果 2 (ng/L)	98.4	(94)	9.71	(97)	9.41	(102)
結果 3 (ng/L)	91.1	(96)	9.50	(96)	10.68	(97)
結果 4 (ng/L)	102.5	(94)	10.76	(94)	10.50	(99)
結果 5 (ng/L)	102.3	(96)	10.44	(89)	10.24	(99)
結果 6 (ng/L)	94.0	(97)	10.10	(94)	10.16	(98)
結果 7 (ng/L)	105.9	(91)	9.75	(93)	10.70	(98)
平均値 (ng/L)	99.15	(94)	9.964	(94)	10.22	(99)
標準偏差	5.16		0.492		0.468	
MDL (ng/L) ^{*3}	20		1.9		1.8	
MQL (ng/L) ^{*4}	52		4.9		4.7	
S/N 比	36		24		35	
CV (%)	5.2		4.9		4.6	

*1：精製水で同様の操作を行い測定した値の平均値 (n=2)

*2：MDL 算出用試料に標準物質を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 2)

*3：MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

*5：括弧内の数値はサロゲート回収率

*6：クロマトグラム上でピークを検出、定量値はIDL 未満

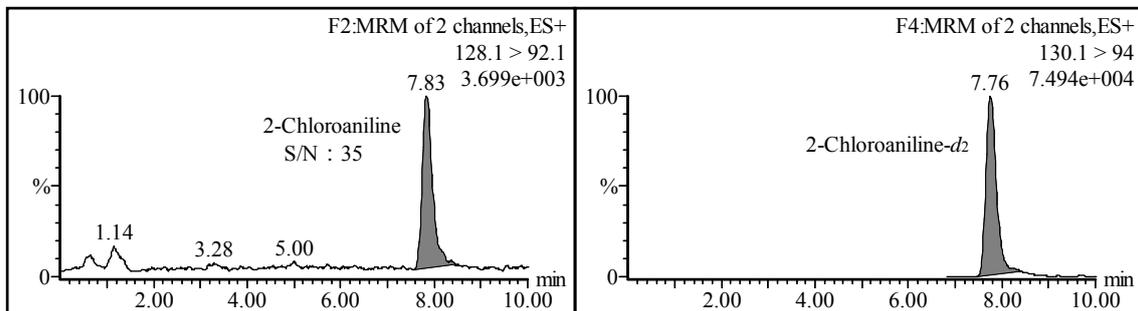


図 2-1 2-クロロアニリンの MDL 算出時のクロマトグラム(10.0 ng 添加)

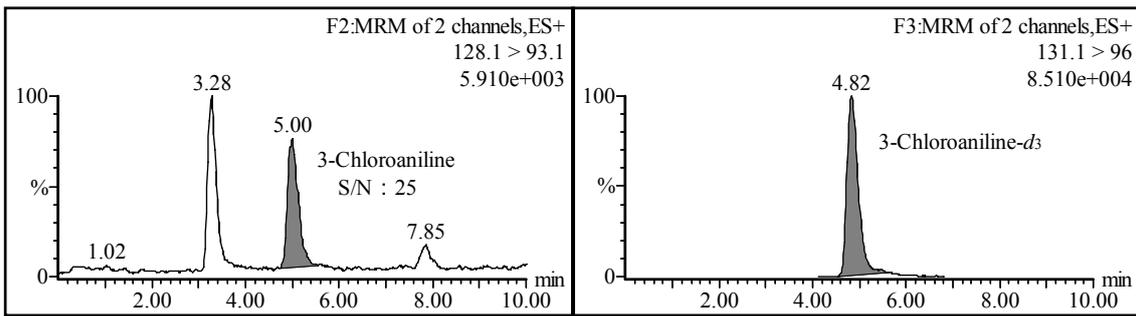


図 2-2 3-クロロアニリンの MDL 算出時のクロマトグラム(1.00 ng 添加)

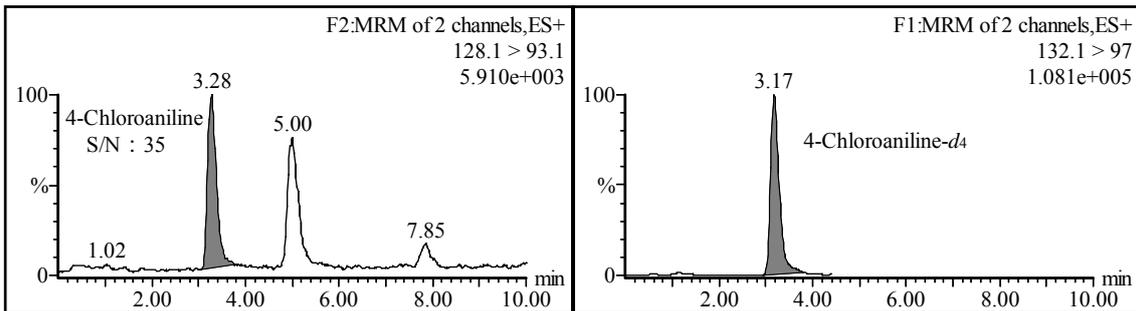


図 2-3 4-クロロアニリンの MDL 算出時のクロマトグラム(1.00 ng 添加)

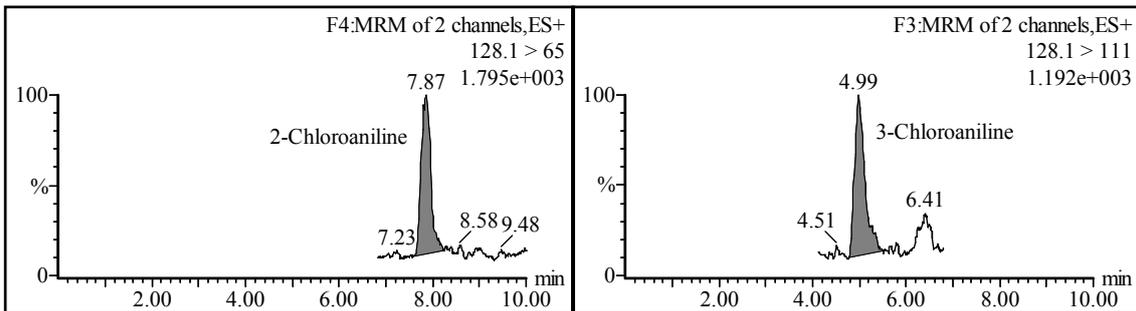


図 3-1 2-クロロアニリン MDL
算出時の確認用イオン
のクロマトグラム

図 3-2 3-クロロアニリン MDL
算出時の確認用イオン
のクロマトグラム

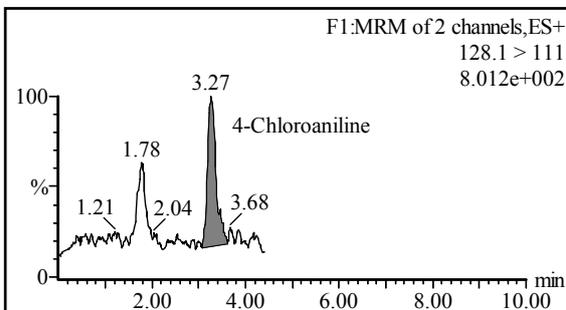


図 3-3 4-クロロアニリン MDL
算出時の確認用イオン
のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図4に示す。

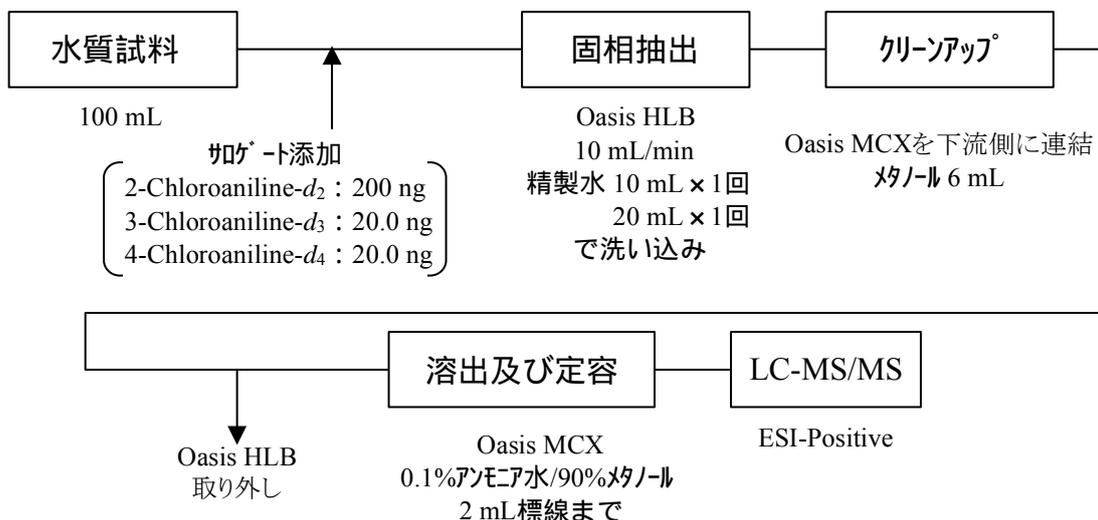


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図5-1～図5-3に、高濃度用検量線を図6-1～図6-3に示す。また、検量線データ一覧を表6-1～表6-3に示す。

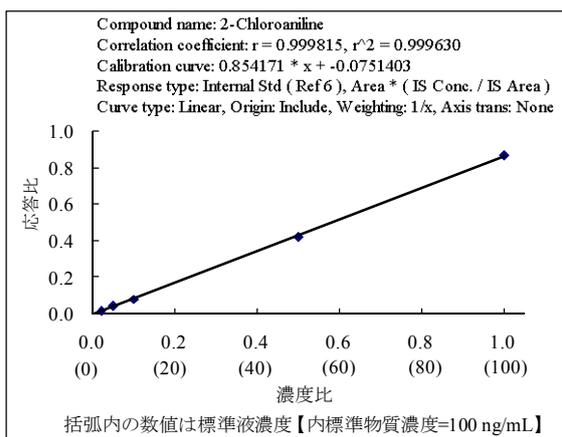


図5-1 2-クロロアニリンの
検量線(2.00 ~ 100 ng/mL)

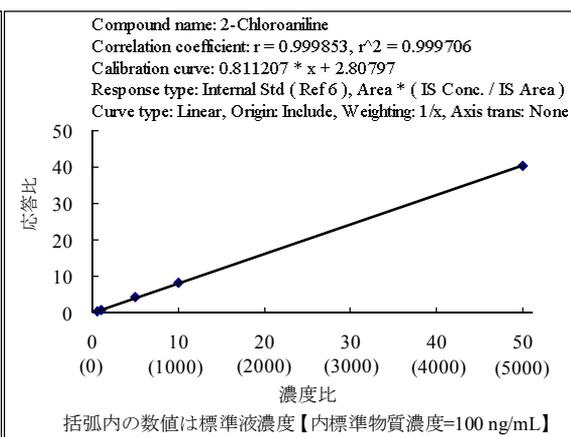


図6-1 2-クロロアニリンの
検量線(50.0 ~ 5000 ng/mL)

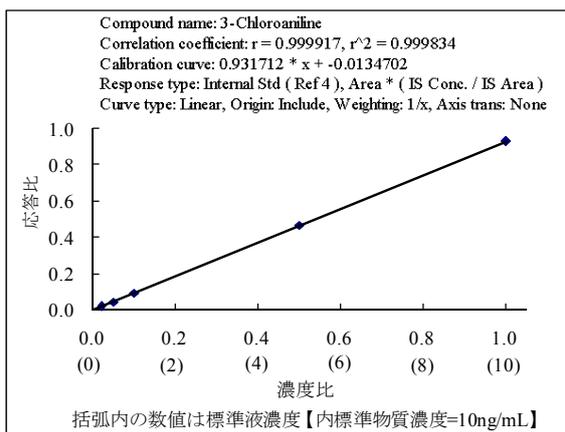


図 5-2 3-クロロアニリンの
検量線(0.200 ~ 10.0 ng/mL)

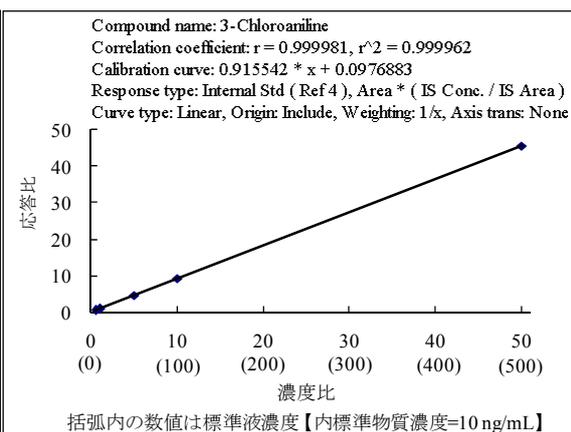


図 6-2 3-クロロアニリンの
検量線(5.00 ~ 500 ng/mL)

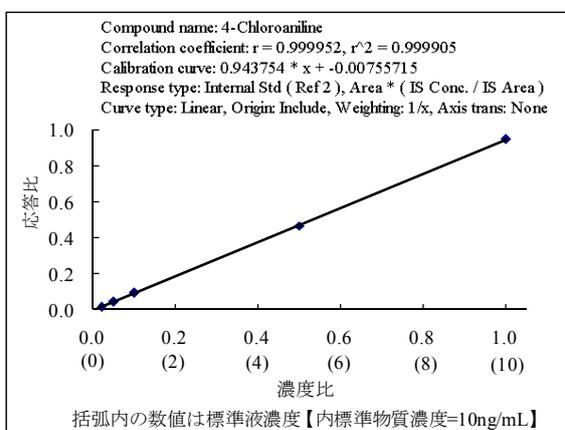


図 5-3 4-クロロアニリンの
検量線(0.200 ~ 10.0 ng/mL)

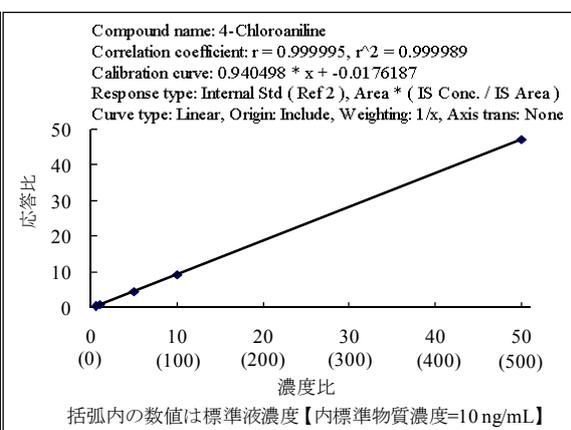


図 6-3 4-クロロアニリンの
検量線(5.00 ~ 500 ng/mL)

表 6-1 2-クロロアニリンの検量線データ一覧

標準液試料濃度 (Cs) (単位: ng/mL)	応答値		応答比 (As/Ars)
	調査物質 (As) 【2-クロロアニリン】 ($m/z = 128.1 > 92.1$)	内標準物質 (Ars) 【2-クロロアニリン- d_2 】 ($m/z = 130.1 > 94.0$)*	
2.00	277	16848	0.016
5.00	705	16798	0.042
10.0	1360	16827	0.081
50.0	6962	16611	0.42
100	14454	16722	0.86
500	69482	16327	4.3
1000	139650	16883	8.3
5000	678561	16852	40

*内標準物質濃度: 100 ng/mL (CrS)

表 6-2 3-クロロアニリンの検量線データ一覧

標準液試料濃度 (Cs) (単位：ng/mL)	応答値		応答比 (As/Ars)
	調査物質 (As) 【3-クロロアニリン】 ($m/z = 128.1 > 93.1$)	内標準物質 (Ars) 【3-クロロアニリン- d_3 】 ($m/z = 131.1 > 96.0$)*	
0.200	336	20340	0.017
0.500	874	20148	0.043
1.00	1875	20378	0.092
5.00	9499	20302	0.47
10.0	19107	20558	0.93
50.0	93439	20210	4.6
100	185819	20046	9.3
500	893014	19566	46

*内標準物質濃度：10.0 ng/mL (Crs)

表 6-3 4-クロロアニリンの検量線データ一覧

標準液試料濃度 (Cs) (単位：ng/mL)	応答値		応答比 (As/Ars)
	調査物質 (As) 【4-クロロアニリン】 ($m/z = 128.1 > 93.1$)	内標準物質 (Ars) 【4-クロロアニリン- d_4 】 ($m/z = 132.1 > 97.0$)*	
0.200	343	19361	0.018
0.500	899	19526	0.046
1.00	1867	20059	0.093
5.00	9088	19487	0.47
10.0	18489	19480	0.95
50.0	92326	19810	4.7
100	181292	19337	9.4
500	876567	18617	47

*内標準物質濃度：10.0 ng/mL (Crs)

〔標準物質のマスペクトル〕

標準物質のマスペクトルを図 7-1～図 7-3 に、 m/z 128.1 のプロダクトイオンのマスペクトルを図 8-1～図 8-3 に示す。

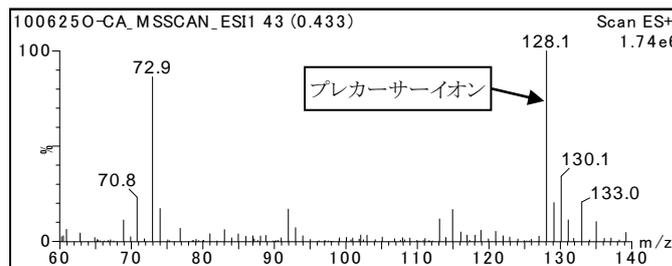


図 7-1 2-クロロアニリンのマスペクトル

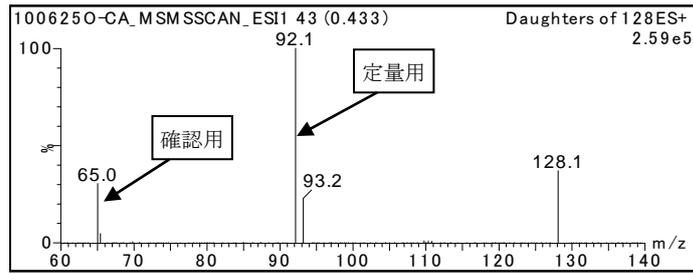


図 8-1 2-クロロアニリン(m/z 128.1)のプロダクトイオンのマススペクトル

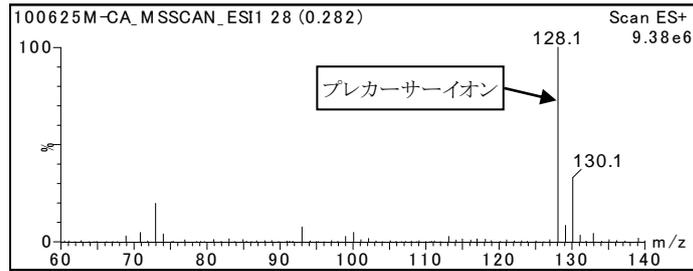


図 7-2 3-クロロアニリンのマススペクトル

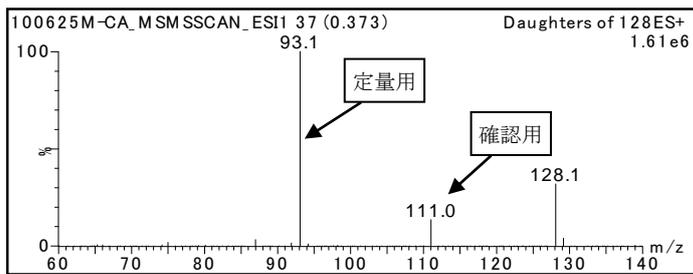


図 8-2 3-クロロアニリン(m/z 128.1)のプロダクトイオンのマススペクトル

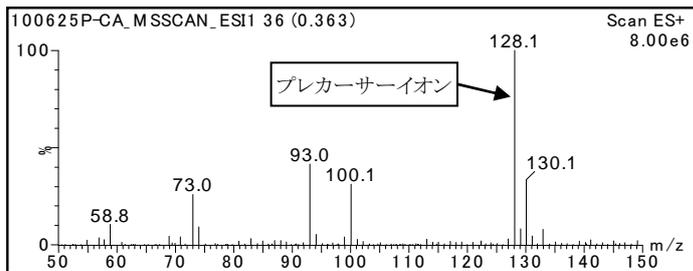


図 7-3 4-クロロアニリンのマススペクトル

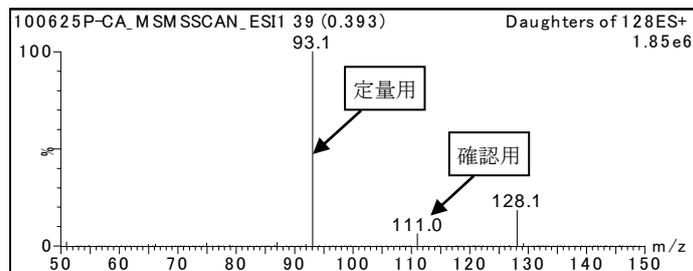


図 8-3 4-クロロアニリン(m/z 128.1)のプロダクトイオンのマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験結果を表 7 に示す。ピークが検出された 4-クロロアニリンのクロマトグラムを図 9 に示す。

表 7 操作ブランク試験結果

物質名	検体数	検出濃度 (ng/L)
2-クロロアニリン	2	ND
3-クロロアニリン	2	ND
4-クロロアニリン	2	tr*

* : クロマトグラム上でピークを検出、定量値は MDL 未満

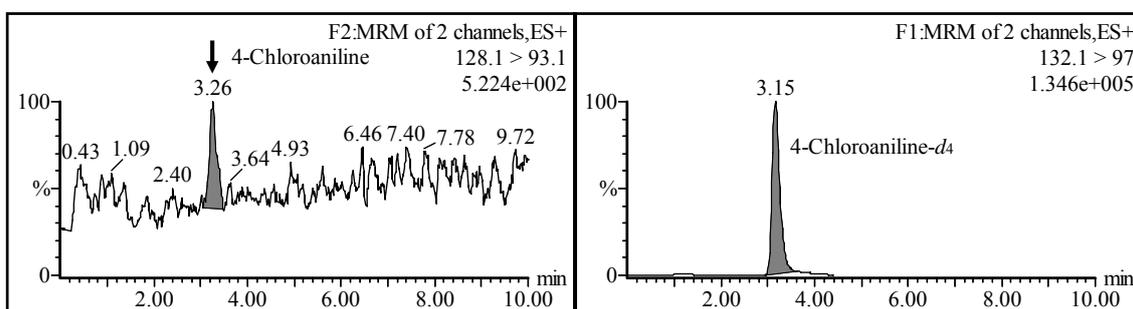


図 9 操作ブランクのクロマトグラム(4-クロロアニリン)

〔添加回収試験〕

河川水(養老川)、海水(袖ヶ浦市中袖地先)への添加回収試験結果を表 8 に示す。海水に標準物質を添加したときのクロマトグラムを図 10-1 ~ 図 10-3 に、無添加試料のクロマトグラムを図 11-1 ~ 図 11-3 に示す。

表 8 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	検体数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率 (%)
河川水 (注 9)	2-クロロアニリン	0.100	無添加	2	ND	-	-	-
		0.100	10	7	99.2	99	5.2	94
	3-クロロアニリン	0.100	無添加	2	ND	-	-	-
		0.100	1.0	7	10.0	100	4.9	94
	4-クロロアニリン	0.100	無添加	2	tr*	-	-	-
		0.100	1.0	7	10.2	102	4.6	99
海 水	2-クロロアニリン	0.100	無添加	2	ND	-	-	-
		0.100	60	5	599	100	1.9	90
	3-クロロアニリン	0.100	無添加	2	ND	-	-	-
		0.100	6.0	5	58.7	98	2.2	94
	4-クロロアニリン	0.100	無添加	2	tr*	-	-	-
		0.100	6.0	5	60.0	100	0.9	95

(注 9) MDL 算出に用いた試験結果

* : クロマトグラム上でピークを検出、定量値は MDL 未満

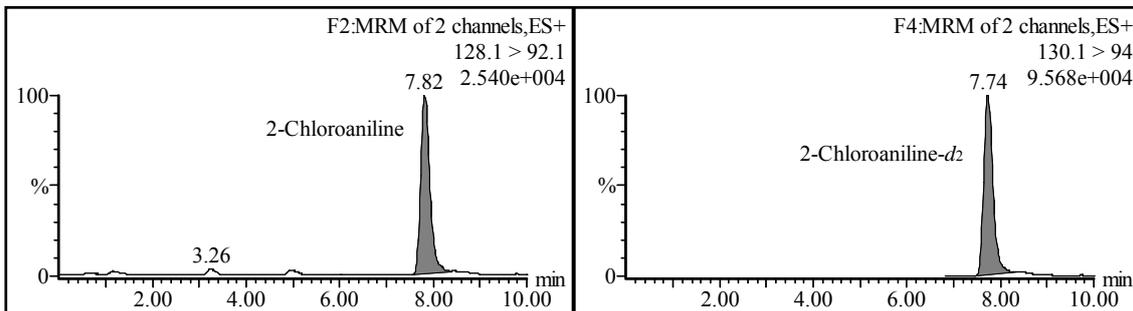


図 10-1 2-クロロアニリン添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

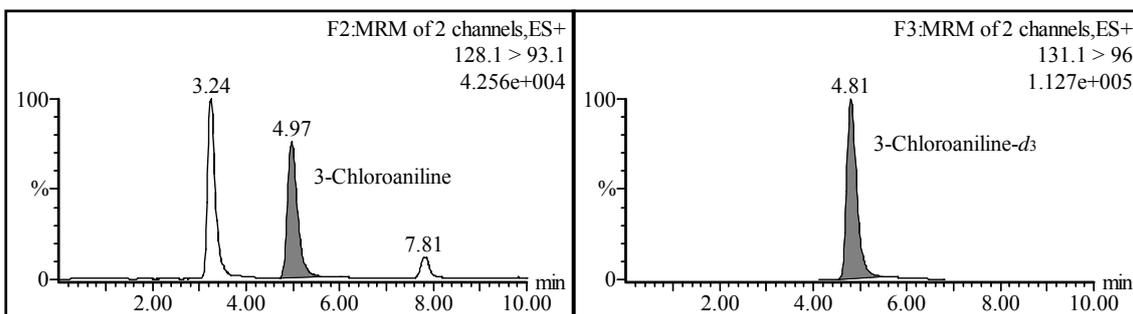


図 10-2 3-クロロアニリン添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

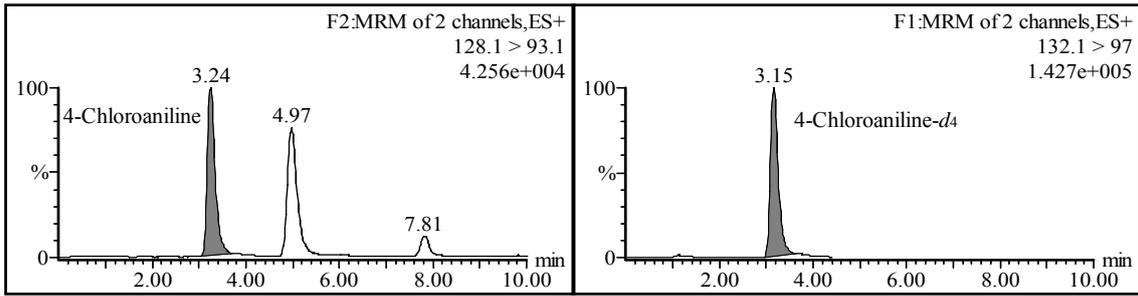


図 10-3 4-クロロアニリン添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

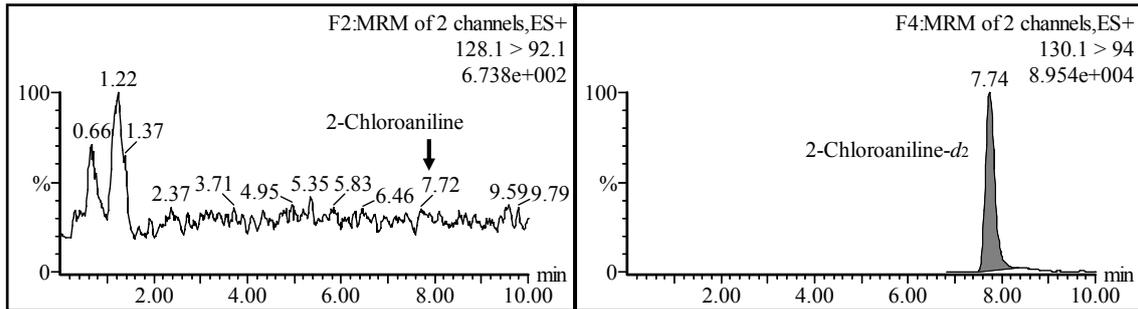


図 11-1 無添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

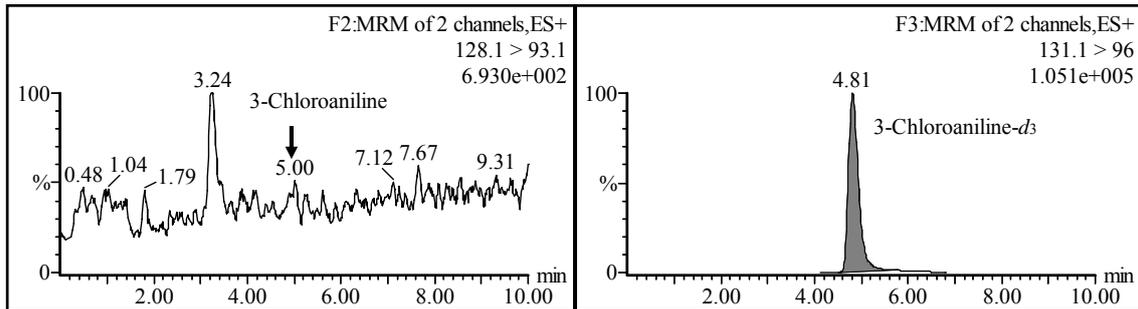


図 11-2 無添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

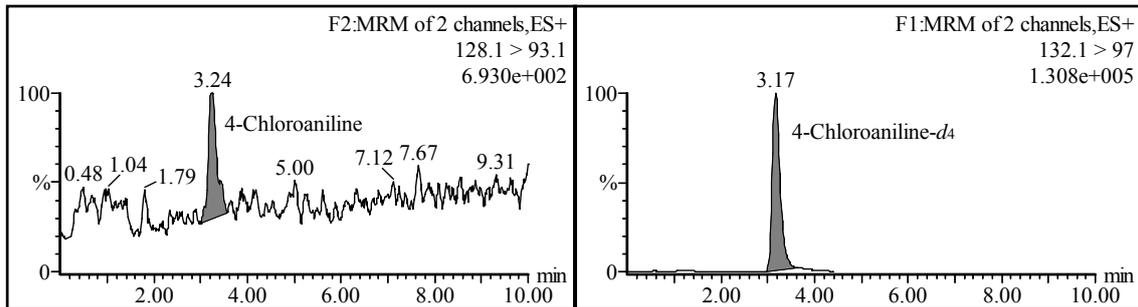


図 11-3 無添加回収試験試料(海水)のクロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験〕

表9 分解性スクリーニング試験結果

pH	物質名	初期濃度 (ng/L)	1時間後の 残存率 (%)	7日後の残存率 (%)	
				暗所	明所
5	2-クロロアニリン	1000	99	99	-
	3-クロロアニリン	100	100	101	-
	4-クロロアニリン	100	101	100	-
7	2-クロロアニリン	1000	99	100	99
	3-クロロアニリン	100	101	103	100
	4-クロロアニリン	100	101	100	92
9	2-クロロアニリン	1000	99	99	-
	3-クロロアニリン	100	101	101	-
	4-クロロアニリン	100	100	100	-

〔保存性試験〕

標準物質を添加した河川水、海水の環境水試料について、直後及び7日後に内標準物質を添加し、試験液の調製を行い測定した。環境水試料、標準液の保存性試験結果を表10に示す。

河川水試料については、7日間の残存率が3-クロロアニリン、4-クロロアニリンにおいて70%以下となったため再度試験を行い、4時間、4日間、7日間の残存率を確認した。試験結果を表11に示す。再試験でも、7日間の保存では4-クロロアニリンの残存率が70%程度となったが、4日間の保存であれば2-クロロアニリン、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンともに残存率は80%以上であった。

試験液の保存性試験結果を表12に示す。試験液は初期濃度測定後に密閉容器で保存し、7日後に同じ試験液を再び測定した。内標準物質も添加した状態で保存しているので、初期濃度、7日後の濃度はともに絶対検量線法により定量を行い、7日間の残存率を確認した。試験液の状態であれば、7日間の保存でも濃度低下は認められないので、すぐにLC/MS測定ができない場合でも、採水後4日以内に【試験液の調製】の操作を行い、試験液としておくことが必要である。

表 10 環境水、標準液の保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/L)	残存率(%)	
			7日間	40日間
2-クロロアニリン	河川水	301	72	-
	海水	300	97	-
	標準液	50	-	102
	(ng/mL)	1000	-	99
3-クロロアニリン	河川水	31.3	64	-
	海水	30.6	97	-
	標準液	50	-	101
	(ng/mL)	1000	-	100
4-クロロアニリン	河川水	33.6	67	-
	海水	33.0	78	-
	標準液	50	-	99
	(ng/mL)	1000	-	100

表 11 河川水試料の保存性再試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/L)	残存率(%)		
			4時間	4日間	7日間
2-クロロアニリン	河川水	301	98	87	82
3-クロロアニリン	河川水	29.2	99	87	75
4-クロロアニリン	河川水	30.6	97	83	71

表 12 試験液の保存性試験結果（絶対検量線法の定量値による）

物質名	試料名	初期濃度 (ng/L)	残存率(%)
			7日間
2-クロロアニリン	河川水	295	96
	海水	291	102
3-クロロアニリン	河川水	27.6	106
	海水	27.3	105
4-クロロアニリン	河川水	25.4	100
	海水	25.4	101

〔環境試料の分析〕

保存性試験時に標準物質無添加の環境水試料中から、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンのピークが検出された。測定結果を表 13、クロマトグラムを図 12-1～12-3、図 13-1～13-3 に示す。

表 13 環境水試料の測定結果

物質名	試料	採水場所 (環境基準類型)	測定結果 (ng/L)
2-クロロアニリン	河川水	養老川浅井橋(B 類型)	ND
	海水	袖ヶ浦市中袖地先(B 類型)	ND
3-クロロアニリン	河川水	養老川浅井橋(B 類型)	tr ^{*1}
	海水	袖ヶ浦市中袖地先(B 類型)	(1.9) ^{*2}
4-クロロアニリン	河川水	養老川浅井橋(B 類型)	(2.3) ^{*2}
	海水	袖ヶ浦市中袖地先(B 類型)	(2.0) ^{*2}

*1: 定量値は MDL 未満

*2: 括弧内の数値は MQL 未満

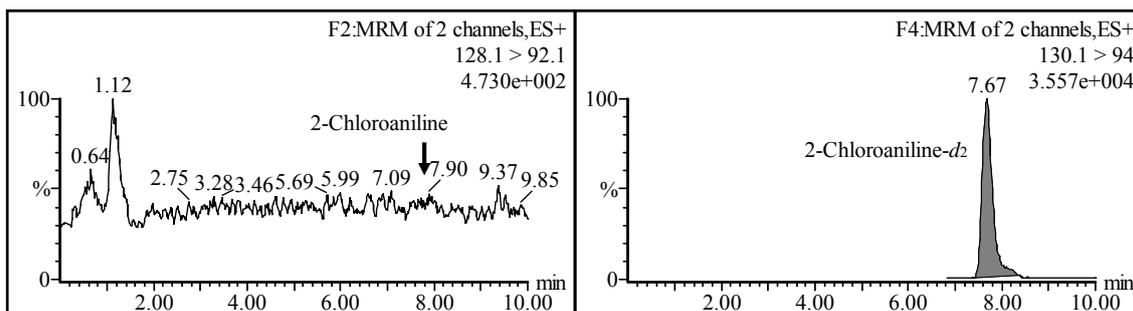


図 12-1 河川水試料のクロマトグラム (2-クロロアニリン)

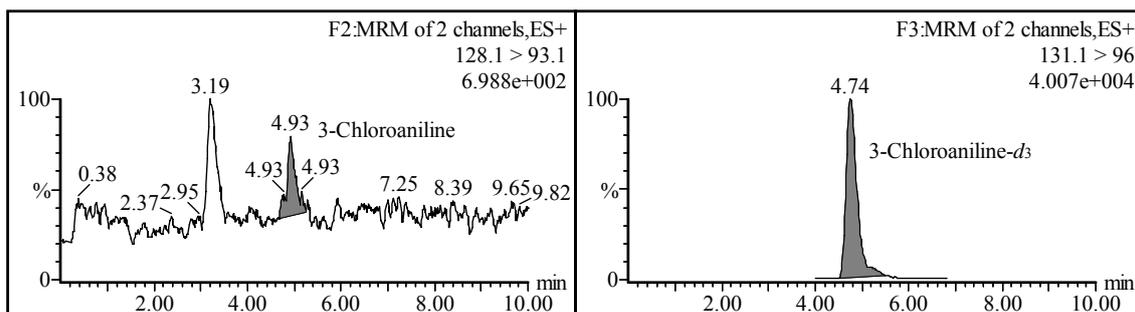


図 12-2 河川水試料のクロマトグラム (3-クロロアニリン)

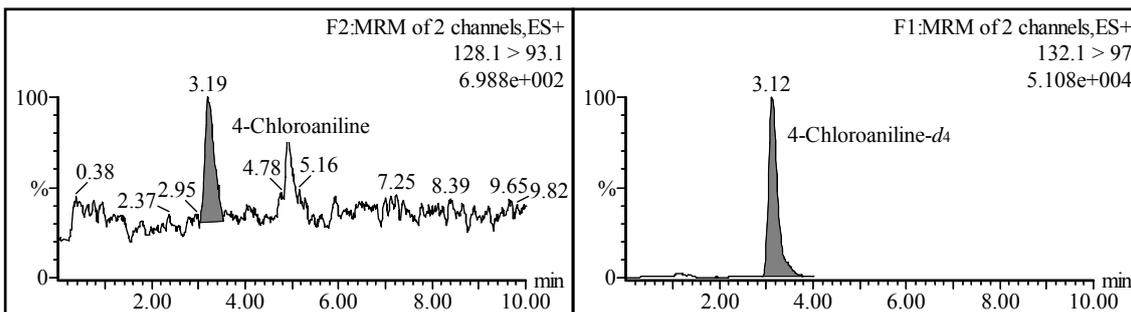


図 12-3 河川水試料のクロマトグラム (4-クロロアニリン)

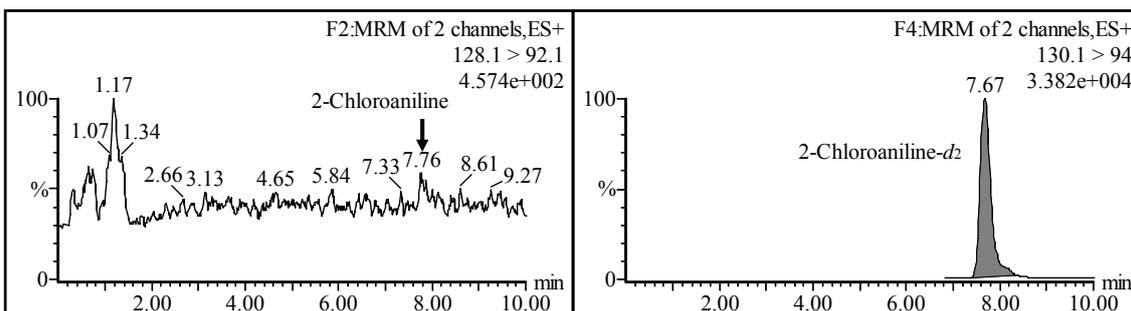


図 13-1 海水試料のクロマトグラム (2-クロロアニリン)

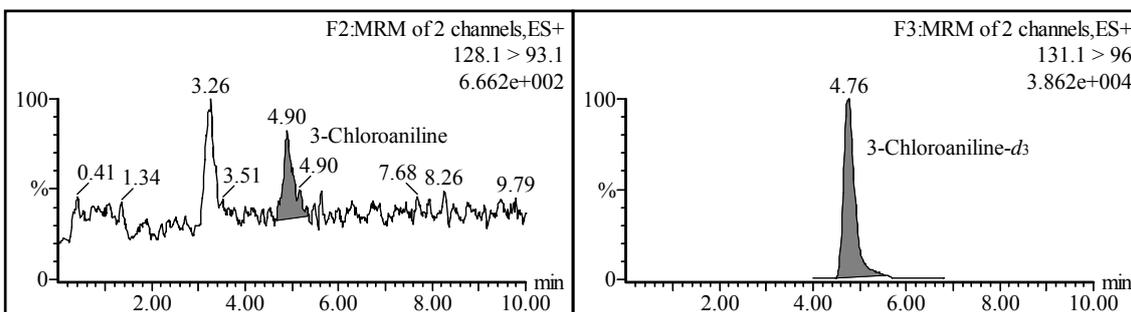


図 13-2 海水試料のクロマトグラム (3-クロロアニリン)

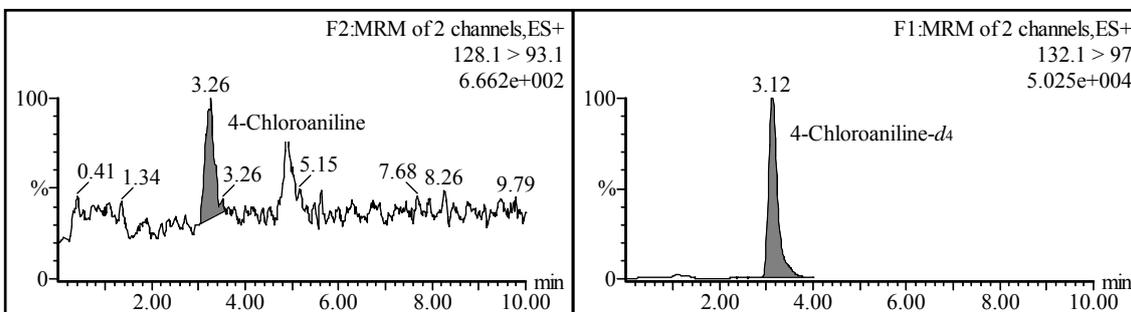


図 13-3 海水試料のクロマトグラム (4-クロロアニリン)

【評価】

本法に用いた LC/MS/MS による IDL は、2-クロロアニリン 0.61 ng/L、3-クロロアニリン 0.073 ng/L、4-クロロアニリンで 0.060 ng/L であり、検量線は 2-クロロアニリンで 2.00 ~ 100 ng/mL、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンで 0.200 ~ 10.0 ng/mL の濃度範囲において良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) を示した。また、高濃度領域の検量線も良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) を示し、2-クロロアニリンで 5000 ng/mL (試料換算値 : 100 μ g/L)、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンで 500 ng/mL (試料換算値 : 10.0 μ g/L) の濃度範囲まで定量できることを確認した。

本法における MDL は 2-クロロアニリンで 20 ng/L、3-クロロアニリンで 1.9 ng/L である。添加回収試験時のこれらのサロゲート回収率も 90% 以上であり、環境水試料において、要求感度 (2-クロロアニリン : 30 ng/L、3-クロロアニリン : 3.2 ng/L) を満たすクロロアニリンを検出することが可能である。また、4-クロロアニリンについても、3-クロロアニリンと同等なレベルで検出が可能である。

環境水の保存性試験で濃度低下が認められたため、試料採水後、すみやかに試験液の調製を行う必要がある。

【担当者連絡先】

所属先名称 : 千葉県環境研究センター

所属先住所 : 〒290-0046 千葉県市原市岩崎西 1-8-8

TEL : 0436-23-7777、FAX : 0436-23-2870

担当者名 : 清水 明、吉澤 正

E-mail : a.shmz5@pref.chiba.lg.jp, t.yshzw@pref.chiba.lg.jp

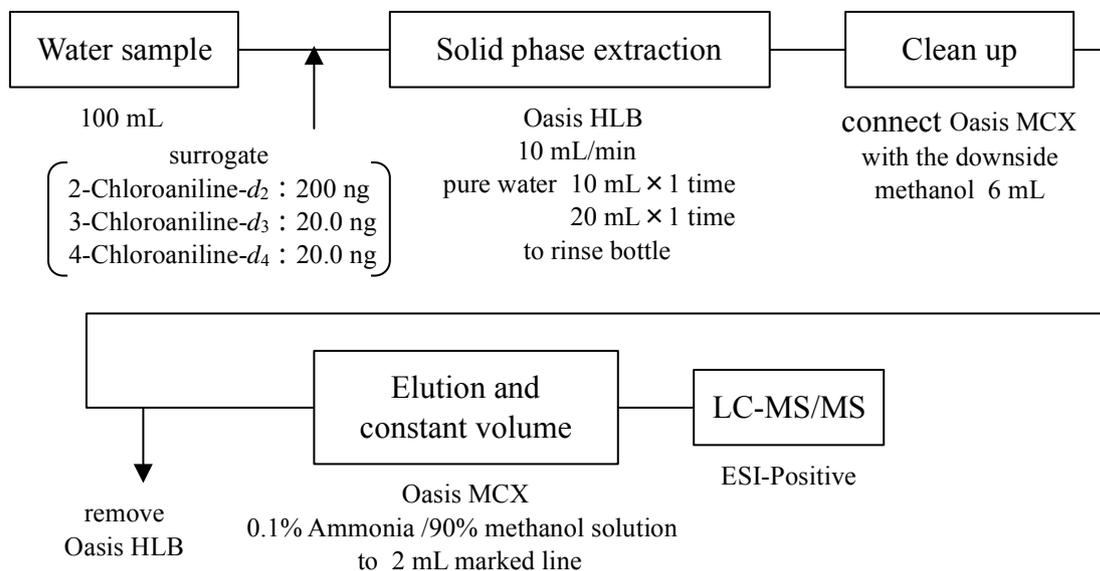
2-Chloroaniline, 3-Chloroaniline, (4-Chloroaniline)

An analytical method has been developed for the determination of 2-, 3-, and 4-Chloroaniline in water by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS/MS). Positive electro- spray ionization (ESI-positive) is used to ionize 2-, 3-, and 4-Chloroaniline and 2-Chloroaniline- d_2 , 3-Chloroaniline- d_3 , 4-Chloroaniline- d_4 as an internal-standard.

A 100 mL water sample is spiked with 2-Chloroaniline- d_2 of 200 ng, 3-Chloroaniline- d_3 of 20.0 ng, 4-Chloroaniline- d_4 of 20.0 ng as surrogate substance. The sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB). The cartridge is connected with a preconditioned solid phase extraction of syringe type (Oasis MCX). The extract is eluted with 6 mL methanol, then, the Oasis MCX is separated from the Oasis HLB. Thereafter, the extract is eluted with 0.1% Ammonia /90% methanol solution from the Oasis MCX, and eluted volume is adjusted to 2 mL. The sample solutions are analyzed by positive ion-ESI-LC/MS/MS-SRM.

The method detection limit (MDL) is 20 ng/L (2-Chloroaniline), 1.9 ng/L (3-Chloroaniline), 1.8 ng/L (4-Chloroaniline), respectively. Three isomer's surrogate recoveries from river water and sea water exceeded 90%, respectively.

It is necessary to extract it at once as much as possible, because the concentrations of Chloroaniline in river water and sea water have decreased for 7 days.



物質名	分析法フローチャート	備考
<p>[1] 2-クロロアニリン [2] 3-クロロアニリン [3] 4-クロロアニリン</p> <p>IUPAC 名： [1] 1-アミノ-2-クロロベンゼン [2] 1-アミノ-3-クロロベンゼン [3] 1-アミノ-4-クロロベンゼン</p> <p>別名： [1] 2-クロロ-1-アミノベンゼン [2] 3-クロロ-1-アミノベンゼン [3] 4-クロロ-1-アミノベンゼン</p>	<p>【水質】</p> <pre> graph TD A[水質試料 100 mL] --> B[固相抽出] C["イオン添加 2-Chloroaniline-d2 : 200 ng 3-Chloroaniline-d3 : 20.0 ng 4-Chloroaniline-d4 : 20.0 ng"] --> B B --> D[溶出及び定容] D --> E[クリーンアップ] E --> F[LC-MS/MS] F --- G[ESI-Positive] </pre> <p>水質試料 100 mL</p> <p>イオン添加 2-Chloroaniline-<i>d</i>₂ : 200 ng 3-Chloroaniline-<i>d</i>₃ : 20.0 ng 4-Chloroaniline-<i>d</i>₄ : 20.0 ng</p> <p>固相抽出 Oasis HLB 10 mL/min 精製水 10 mL × 1回 20 mL × 1回 で洗い込み</p> <p>溶出及び定容 Oasis MCX 0.1%アンモニア水/90%メタノール 2 mL 標線まで</p> <p>クリーンアップ Oasis MCXを下流側に連結 メタノール 6 mL</p> <p>Oasis HLB 取り外し</p> <p>LC-MS/MS ESI-Positive</p>	<p>分析原理： LC/MS/MS -SRM ESI(+)</p> <p>検出下限値 【水質】 [1] 20 ng/L [2] 1.9 ng/L</p> <p>分析条件： 機器 Waters Alliance 2695 Quattro micro API</p> <p>カラム Ascentis RP-Amide (150 mm × 2.1 mm, 3 μm)</p>