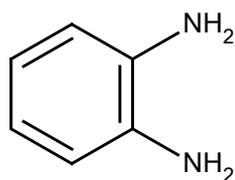


o-フェニレンジアミン *o*-Phenylenediamine

IUPAC 名：ベンゼン-1,2-ジアミン
Benzene-1,2-diamine

別名：1,2-ジアミノベンゼン、1,2-ベンゼンジアミン、*o*-アミノアニリン
1,2-diaminobenzene, 1,2-benzenediamine, *o*-aminoaniline

【対象物質の構造】



CAS 番号：95-54-5

分子式：C₆H₈N₂

【物理化学的性状】¹⁾⁻⁴⁾

| 項目 | 値 | 測定条件 | 出典 |
|-------------------------|----------|------|----|
| 分子量 | 108.1 | - | - |
| モノアイソトピック質量 | 108.0687 | - | - |
| 融点 (°C) | 103-104 | - | 1 |
| 沸点 (°C) | 256-258 | - | 1 |
| 水溶解度 (g/L) | 31.1 | 20°C | 2 |
| 蒸気圧 (mmHg) | 0.01 | 25°C | 3 |
| log P _{ow} | 0.15 | - | 3 |
| 密度 (g/cm ³) | 1.14 | 20°C | 4 |

【毒性、用途】

| | | |
|------------------------|------|---|
| 生分解性・濃縮性 ⁵⁾ | | 難分解性ではあるが高濃縮性ではない |
| 環境影響 ⁵⁾ | 藻類 | 72 時間 EC ₅₀ : 0.82 mg/L、NOEC : 0.37 mg/L (セ レナストラム成長阻害試験、速度法) 72 時間 EC ₅₀ : 1.1 mg/L、NOEC : 0.56 mg/L (セ レナストラム成長阻害試験、面積法) |
| | 甲殻類 | 48 時間 EC ₅₀ : 1.4 mg/L (オオミジンコ急性遊泳 阻害試験) 21 日間 EC ₅₀ : 0.35 mg/L、NOEC : 0.083 mg/L (オ オミジンコ繁殖阻害試験) |
| | 魚類 | 96 時間 LC ₅₀ : 4.6 mg/L (メダカ急性毒性試験) |
| 健康影響 ^{5),6)} | 致死量 | LD ₅₀ 366 mg/kg (マウス 経口) 510 mg/kg (ラット 経口) LC ₅₀ >91 mg/m ³ (マウス 吸入 4h) 1873 mg/m ³ (ラット 吸入) |
| | 発がん性 | 動物に対して発がん性が確認された物質であ るが、ヒトへの関連性は不明 |
| 用途 ⁷⁾ | | アゾ染料・白毛染料・ゴム加硫促進剤・写真現 像薬原料 |

出典

- 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
- 4) International Uniform Chemical Information Database IUCLID Data Set
- 5) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム(CHRIP)
- 6) US National Institute for Occupational Safety and Health Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Database
- 7) 化学工業日報社

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料に炭酸水素ナトリウム (注 1) とサロゲート物質を添加し、クロロギ酸エチルと反応させて誘導体化する。ジクロロメタンで溶媒抽出し、脱水、濃縮する。必要に応じてシリカゲルカートリッジでクリーンアップを行い、シリンジスパイクを添加し GC/MS-SIM で分析する。*m*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミンの同時分析も可

能である。

(2) 試薬・器具

【試薬】

| | |
|--|---|
| <i>o</i> -フェニレンジアミン | : 和光純薬工業製 1級 (含量 95%) |
| <i>m</i> -フェニレンジアミン | : 和光純薬工業製 1級 (含量 95%) |
| <i>p</i> -フェニレンジアミン | : 和光純薬工業製 1級 (含量 97%) |
| <i>o</i> -フェニレンジアミン-3,4,5,6- <i>d</i> ₄ | : 和光純薬工業製 (含量 90%) |
| クロロギ酸エチル | : 関東化学製 特級 (注2) |
| フルオランテン- <i>d</i> ₁₀ | : 関東化学製 (含量 98.7%) |
| 1%PEG200 アセトン溶液 | : ポリエチレングリコール 200 (和光純薬工業製 1級) を 500 mg 量り取り、アセトンで 50 mL とする。 |
| 亜硫酸ナトリウム | : 関東化学製 特級 |
| エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (EDTA) | : 関東化学製 特級 |
| 炭酸水素ナトリウム | : 関東化学製 特級 |
| ヘキサン、ジクロロメタン | : 関東化学製 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮) |
| 精製水 | : Milli-Q 水 |
| 無水硫酸ナトリウム | : 関東化学製 残留農薬試験、PCB 試験用 (注3) |
| シリカゲルカートリッジ | : SUPELCO 製 500 mg/6 mL Supelclean LC-Si (注4) |

【標準液の調製】 (注5)

〔標準液〕

o-フェニレンジアミン 50.0 mg を正確に量り取り、亜硫酸ナトリウム 50 mg を添加し、精製水に溶解して 50 mL に定容し 1000 µg/mL の標準原液とする。*m*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミンについても同様の操作を行い、各 1000 µg/mL の標準原液を調製する。各標準原液を 1 mL ずつ分取し、100 mL に定容して 10.0 µg/mL の混合標準液を調製する。必要に応じてさらに希釈を行い、1.00 µg/mL の混合標準液を調製する。

〔サロゲート標準液〕 (注5)

o-フェニレンジアミン-3,4,5,6-*d*₄ 5.00 mg を正確に量り取り、亜硫酸ナトリウム 50 mg を添加し、精製水に溶解して 50 mL に定容し 100 µg/mL のサロゲート標準原液とする。これを精製水で希釈し 10.0 µg/mL のサロゲート標準液を調製する。

〔内標準液〕

フルオランテン-*d*₁₀ 5.00 mg を正確に量り取り、少量のアセトンで溶解しヘキサンを加

えて50 mLに定容し100 µg/mLの内標準原液を調製する。これをヘキサンで希釈して10.0 µg/mLの内標準液とする。

〔検量線用標準液〕

精製水100 mLに標準液(10.0 µg/mL、1.00 µg/mL)を0~20.0 µL加え、後述する【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を検量線用標準液とする。

【器具】(注6)

振とう機、ロータリーエバポレータ、窒素濃縮装置

分液ロート(300 mL)、三角フラスコ(100 mL)、ナス型フラスコ(100 mL)、メスシリンダー(100 mL)、スピッツ型遠沈管(10 mL)、全量フラスコ、全量ピペット：洗剤で洗浄後、精製水によるすすぎを行い、さらにアセトンで洗浄し乾燥させる。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)の「試料の採取及び検体の調製等」に従う。試料採取後ただちに試料1 Lあたり各1 gの亜硫酸ナトリウム及びEDTAを添加し(注7)、振とうして溶解させる。対象物質は分解性が高いため、試料の分析はできる限り速やかに行い、採取後7日以内に行うことが望ましい。

【試料の前処理及び試験液の調製】

〔誘導体化(注8)、溶媒抽出〕

分液ロート(300 mL)に水質試料100 mLを量り取り、サロゲート標準液(10 µg/mL)10.0 µL及び炭酸水素ナトリウム5 gを加え振とう、溶解後、ジクロロメタン10 mL、クロロギ酸エチル0.5 mLを添加して5分間振とうする(注9)。ジクロロメタン層を三角フラスコに採取後、再びジクロロメタン10 mLを加えて振とうし、抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水する。抽出液をナス型フラスコに移し、三角フラスコをジクロロメタンで洗浄する。洗液は抽出液と合わせ、ロータリーエバポレータで濃縮し、約5 mLとする。これをスピッツ型遠心管に洗いこみ、窒素気流中で0.2 mLまで濃縮し、ヘキサンで1 mLに定容する。内標準としてフルオランテン-*d*₁₀(10 µg/mL)5.00 µLを加えてGC/MS-SIMで定量する。

〔クリーンアップ〕(注10)

妨害が認められる場合にはクリーンアップを行う。試料を誘導体化後ジクロロメタンで抽出し、ロータリーエバポレータで約5 mLに濃縮した後、コンディショニングしたシリカゲルカートリッジに負荷する。ジクロロメタン5 mLを流し、溶出液は捨てる。

続いて20%アセトン含有ヘキサン 10 mL で溶出し、窒素気流下で 1 mL まで濃縮し、内標準としてフルオランテン- d_{10} (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 5.00 μL を加えて GC/MS-SIM で定量する。

【空試験液の調製】

試料と等量の精製水を用い、亜硫酸ナトリウムと EDTA を各 100 mg 添加後【試料の前処理及び試験液の調製】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】

〔GC/MS 条件〕

| | | |
|------------|---|------------------------|
| 使用機種 | : GC : ThermoFisher Scientific 製 TRACE GC ULTRA MS : ThermoFisher Scientific 製 TSQ QUANTUM | |
| 使用カラム | : DB-17ms 30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm | |
| カラム温度 | : 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) \rightarrow 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 200 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 240 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 280 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) | |
| 試料導入方法 | : スプリットレス (ページ開始時間 1.0 min) | |
| 注入口温度 | : 240 $^{\circ}\text{C}$ | |
| キャリアーガス | : He 1.5 mL/min | |
| 試料注入量 | : 1 μL | |
| インターフェース温度 | : 250 $^{\circ}\text{C}$ | |
| イオン源温度 | : 230 $^{\circ}\text{C}$ | |
| イオン化電圧 | : 70 eV | |
| イオン化電流 | : 50 μA | |
| 検出モード | : SIM | |
| モニターイオン | : <i>o</i> -フェニレンジアミン誘導体 | 定量用 206.0 確認用 252.0 |
| | <i>m</i> -フェニレンジアミン誘導体 | 定量用 252.0 確認用 206.0 |
| | <i>p</i> -フェニレンジアミン誘導体 | 定量用 252.0 確認用 206.0 |
| | <i>o</i> -フェニレンジアミン-3,4,5,6- d_4 誘導体 | 定量用 210.0 確認用 256.0 |
| | フルオランテン- d_{10} | 定量用 212.1 |

〔検量線〕 (注 11)

検量線用標準液 1 μL を GC/MS に注入し、*o*-フェニレンジアミンの場合はサロゲート物質との濃度比、*m*、*p*-フェニレンジアミンの場合は内標準物質との濃度比、及び対象物質とサロゲート物質あるいは内標準物質との面積比から検量線を作成する。

〔定量〕 (注11)

試験液 1 μ L を GC/MS に注入し、*o*-フェニレンジアミンの場合は対象物質とサロゲート物質の面積比を、*m*、*p*-フェニレンジアミンの場合は対象物質と内標準物質の面積比を検量線に照らして定量する。

〔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 : 検量線から求めた濃度比

Q : *o*-フェニレンジアミンの場合は添加したサロゲート、*m*、*p*-フェニレンジアミンの場合は内標準物質の量 (ng)

V : 試料水量 (L)

〔サロゲート回収率の算出〕

内標準物質とサロゲートの面積比からサロゲートの回収率を求める。

〔装置検出下限値 (IDL)〕

本分析に用いた GC/MS の IDL を表 1 に示す (注 12)。

表 1 IDL の算出結果

| 物質名 | IDL (ng/mL) | 試料量 (mL) | 最終液量 (mL) | IDL試料換算値 (ng/L) |
|---------------------|----------------|-------------|--------------|--------------------|
| <i>o</i> -フェニレンジアミン | 0.42 | 100 | 1.0 | 4.2 |
| <i>m</i> -フェニレンジアミン | 0.61 | 100 | 1.0 | 6.1 |
| <i>p</i> -フェニレンジアミン | 1.3 | 100 | 1.0 | 13 |

〔測定方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値 (MQL)〕

本測定方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 13)。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

| 物質 | 試料量 (mL) | 最終液量 (mL) | MDL (ng/L) | MQL (ng/L) |
|---------------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| <i>o</i> -フェニレンジアミン | 100 | 1.0 | 7.9 | 20 |
| <i>m</i> -フェニレンジアミン | 100 | 1.0 | 7.5 | 19 |
| <i>p</i> -フェニレンジアミン | 100 | 1.0 | 9.6 | 25 |

注 解

- (注1) クロロギ酸エチルによる誘導体化では塩化水素の副生により溶液が酸性になり誘導体化を阻害するため、あらかじめ塩基性にしておく必要があるが、水酸化ナトリウム等の強塩基を用いた場合には回収率が低下するため、弱塩基の炭酸水素ナトリウムを用いる。
- (注2) クロロギ酸エチルは水と接触することで分解し、白煙（塩酸ミスト）が発生するため、局所排気装置（ドラフト）中で取り扱うとともに、水との接触を避けて保存する。
- (注3) 無視できない汚染が認められる場合は、600°Cで4時間以上加熱後放冷する。
- (注4) 樹脂製シリカゲルカートリッジを用いると妨害物質が溶出することがあるため、ガラス製カートリッジを用いる。シリカゲルカートリッジは使用前にジクロロメタン5 mLを流してコンディショニングを行う。
- (注5) 標準品が水に溶けにくい場合には少量のメタノールに溶解し、精製水で定容する。標準品が酸化されて褐色に着色した場合に水に溶けにくくなるため、無色に近いものを用いるのが望ましい。フェニレンジアミン標準原液は5°Cで保存し、保存期間は2週間を限度とする。希釈後は直ちに使用し、保存はしない。
- (注6) フェニレンジアミンは水道水中の酸化性物質により分解されやすいため、洗浄時に残留塩素等が残存しないよう留意する。
- (注7) フェニレンジアミンの酸化による分解を抑制するため、酸化防止剤として亜硫酸ナトリウム及びEDTAを添加する。海水の場合は亜硫酸ナトリウムが溶けにくいいため、試料ビンの半分程度まで試料を採取後添加して激しく振とうする。大部分が溶解したら試料を満水になるまで入れ、再び振とうする。
- (注8) 誘導体化率の確認等で*o*-フェニレンジアミン誘導体の標準品及び標準液が必要な場合は以下のように作成する。

o-フェニレンジアミン0.1 g及び炭酸水素ナトリウム0.3 gを量り取り、精製水10 mLに溶解する。溶液を攪拌しながらクロロギ酸エチル0.3 mLを滴下し、30分攪拌する。生成した白色固体をろ過し、精製水10 mLで2回、ヘキサン10 mLで1回洗浄する。白色固体をジクロロメタン5 mLに溶解し、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタン溶液にヘキサン5 mLを加え、白色固体が再び析出する直前まで加熱濃縮後-20°Cで静置し、生じた白色固体をろ過する。白色固体をヘキサンで洗浄後、減圧下で乾燥する。再結晶により精製した*o*-フェニレンジアミン誘導体11.7 mg (*o*-フェニレンジアミンとして5.00 mgに相当)を正確に量り取り、ジクロロメタンに溶解して50 mLに定容し100 mg/Lの誘導体標準原液とする。

o-フェニレンジアミン誘導体の感度はマトリックスの影響を受けるため、

標準液にポリエチレングリコール (PEG200 アセトン溶液(10 g/L) 10 μL) を添加するか、空試験液に *o*-フェニレンジアミン誘導体標準液を添加したマトリックス標準液を用いて測定する。

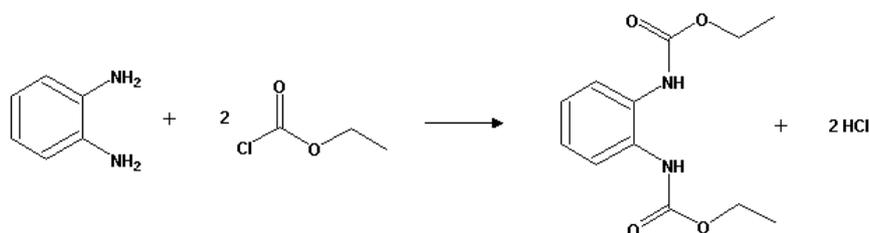


図1 誘導体化の反応式

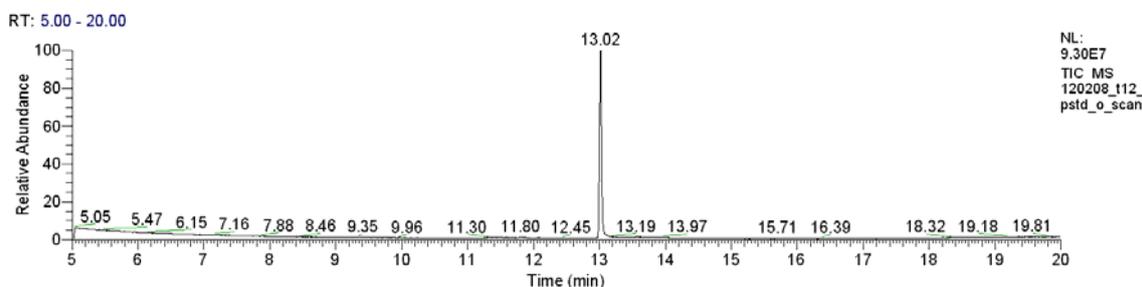


図2 精製した *o*-フェニレンジアミン誘導体のクロマトグラム (scan 測定 of TIC)

- (注9) 誘導体化後、水層が pH 8~9 程度であることを確認する。
- (注10) MS の感度がマトリックスの影響を受けることがあるため、クリーンアップを行う場合は検量線標準液も同様の操作をすることが望ましい。
- (注11) しばらく使用していない機器で分析を行う場合、事前に試験液を何度か測定するとマトリックスで飽和した状態になり、感度が向上するとともに安定し、より正確な定量が行えるようになる。
- (注12) IDL は、「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、次のとおり算出した。

m-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンの誘導体のクロマトグラムは図3のようにテーリングしやすく、特にカラムの劣化によってテーリングが大きくなる。試験液に PEG (1%PEG200 アセトン溶液 10 μL) を添加することで、ある程度ピーク形状が改善する (図15 参照)。

表3 IDL の算出結果

| 対象物質名 | <i>o</i> -フェニレンジアミン | <i>m</i> -フェニレンジアミン | <i>p</i> -フェニレンジアミン |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 試料量 (mL) | 100 | 100 | 100 |
| 最終液量 (mL) | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 注入液濃度 (ng/mL) | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 装置注入量 (μL) | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 結果 1 (ng/mL) | 4.84 | 5.17 | 3.80 |
| 結果 2 (ng/mL) | 4.59 | 4.98 | 3.91 |
| 結果 3 (ng/mL) | 4.81 | 5.15 | 3.88 |
| 結果 4 (ng/mL) | 4.88 | 4.82 | 4.34 |
| 結果 5 (ng/mL) | 4.75 | 5.08 | 3.89 |
| 結果 6 (ng/mL) | 4.72 | 5.18 | 4.46 |
| 結果 7 (ng/mL) | 4.90 | 5.30 | 4.65 |
| 平均値 (ng/mL) | 4.785 | 5.097 | 4.132 |
| 標準偏差 (ng/mL) | 0.108 | 0.157 | 0.339 |
| IDL (ng/mL)* | 0.42 | 0.61 | 1.3 |
| IDL 試料換算値 (ng/L) | 4.2 | 6.1 | 13 |
| S/N | 12 | 10 | 5.0 |
| CV (%) | 2.2 | 3.1 | 8.2 |

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

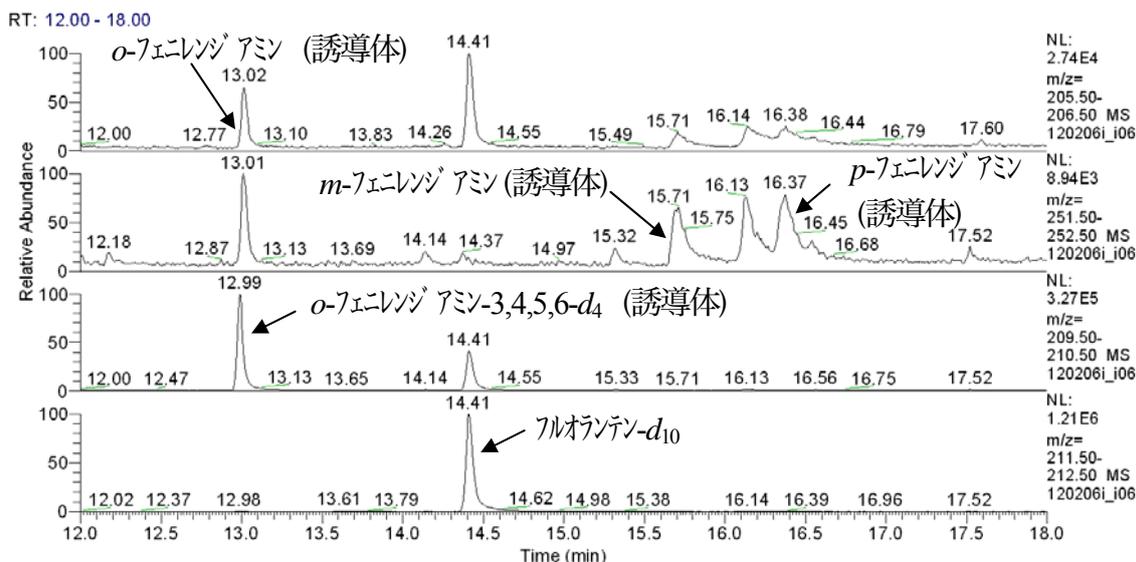


図3 IDL 算出用試料のクロマトグラム (5.00 ng/mL、 $m/z=206$ (上図)、252 (下図))

(注13) MDL及びMQLは、「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、次のとおり算出した。ただし、前処理においてクリーンアップ操作を行った。

表4 MDL及びMQLの算出結果

| 対象物質名 | <i>o</i> -フェニレンジアミン | <i>m</i> -フェニレンジアミン | <i>p</i> -フェニレンジアミン |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| 試料 | 河川水 | 河川水 | 河川水 |
| 試料量 (mL) | 100 | 100 | 100 |
| 標準添加量 (ng) | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 試料換算濃度 (ng/L) | 50 | 50 | 50 |
| 最終液量 (mL) | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 注入液濃度 (ng/mL) | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 装置注入量 (μL) | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1} | ND (88) ^{*5} | ND | ND |
| 無添加平均 (ng/L) ^{*2} | ND (86) | ND | ND |
| 結果1 (ng/L) | 44.2 (88) | 47.8 | 19.4 |
| 結果2 (ng/L) | 47.1 (92) | 51.8 | 20.5 |
| 結果3 (ng/L) | 50.5 (88) | 50.6 | 25.5 |
| 結果4 (ng/L) | 45.5 (95) | 53.1 | 18.8 |
| 結果5 (ng/L) | 47.4 (90) | 49.3 | 19.6 |
| 結果6 (ng/L) | 48.3 (94) | 48.3 | 19.7 |
| 結果7 (ng/L) | 47.8 (88) | 51.3 | 17.9 |
| 平均値 (ng/L) | 47.25 (91) | 50.32 | 20.18 |
| 標準偏差 (ng/L) | 2.03 | 1.94 | 2.46 |
| MDL (ng/L) ^{*3} | 7.9 | 7.5 | 9.6 |
| MQL (ng/L) ^{*4} | 20 | 19 | 25 |
| S/N | 12 | 10 | 3.0 |
| CV (%) | 4.3 | 3.9 | 12 |

*1：試料マトリックスのみがない状態で他は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

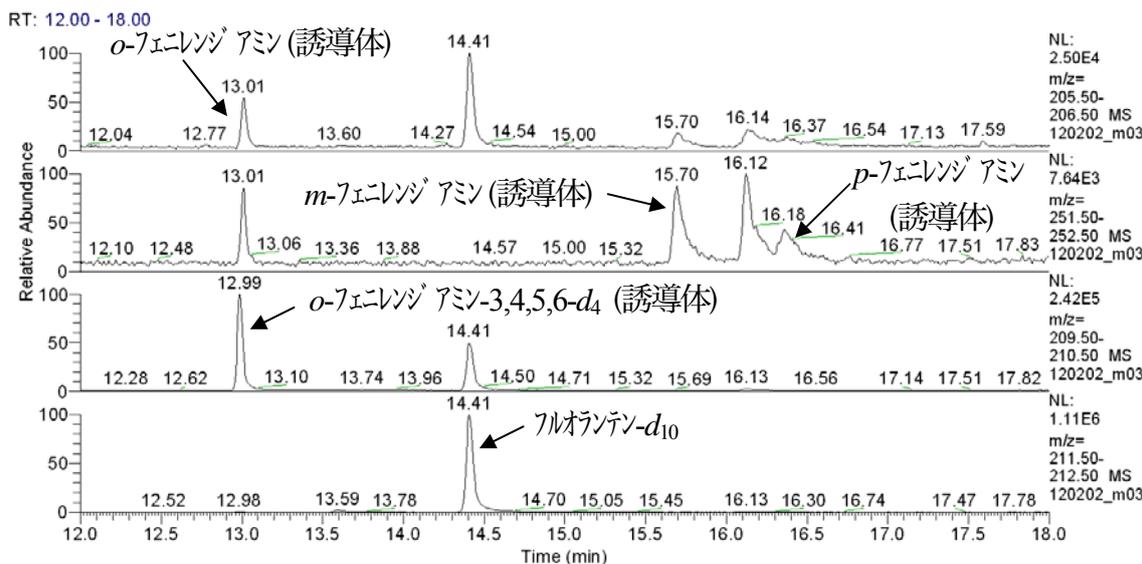


図4 MDL 算出用試料のクロマトグラム (5.0 ng/mL、 $m/z=206$ (上図)、 252 (下図))

S 2 解説

【分析法】

分析のフローチャート (図5) 及び検量線 (図6) を示す。

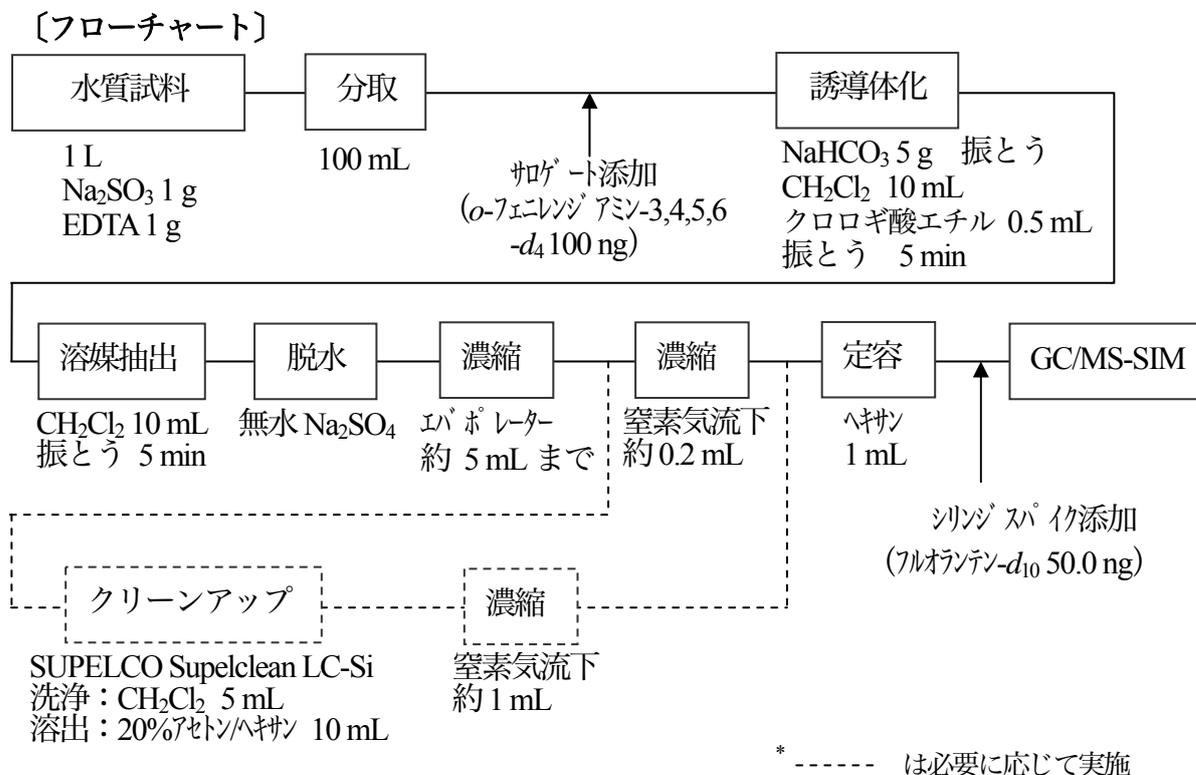


図5 分析法のフローチャート

〔検量線〕

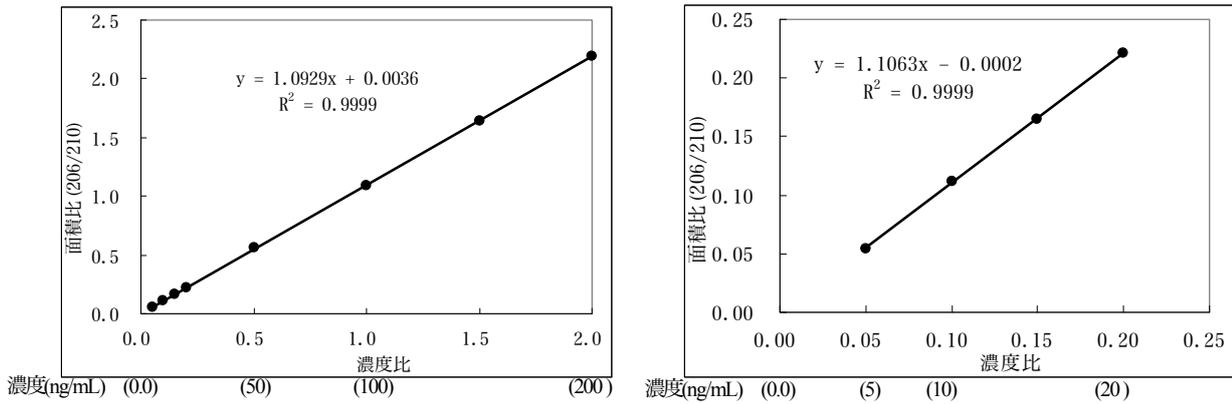


図6-1 *o*-フェニレンジアミン検量線

(サロゲート物質：*o*-フェニレンジアミン-3,4,5,6-*d*₄ 100 ng/mL)

(対象物質濃度範囲：5.00~200 ng/mL (左図)、5.00~20.0 ng/mL (右図))

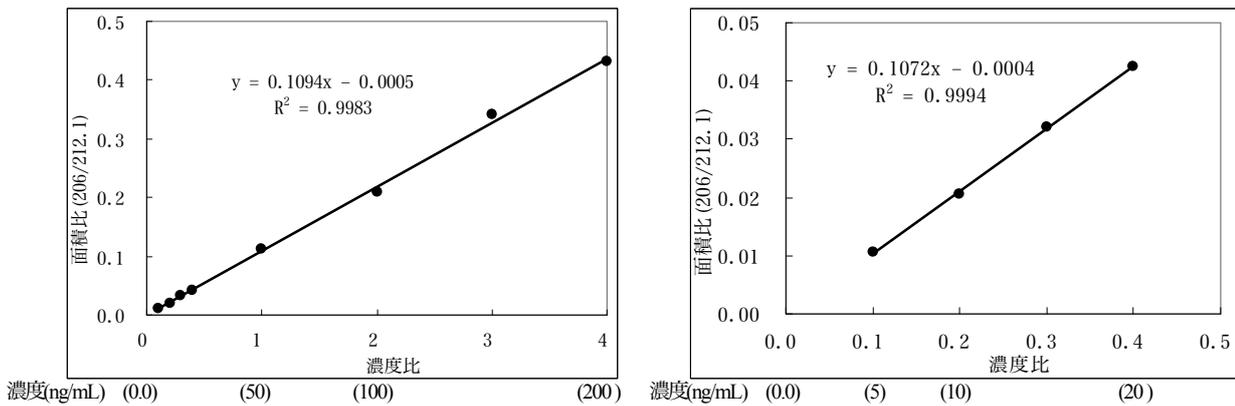


図6-2 *o*-フェニレンジアミン検量線 (参考)

(内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀ 50.0 ng/mL)

(対象物質濃度範囲：5.00~200 ng/mL (左図)、5.00~20.0 ng/mL (右図))

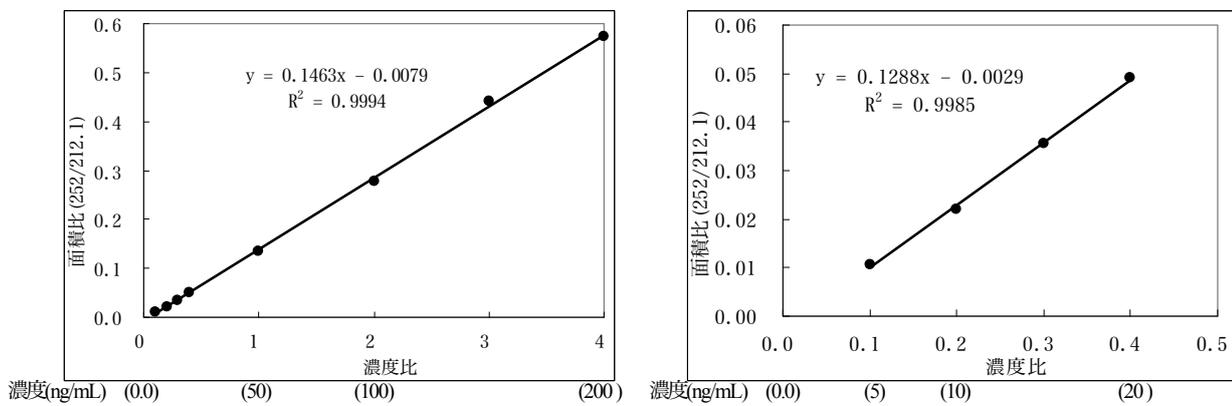


図6-3 *m*-フェニレンジアミン検量線 (内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀ 50.0 ng/mL)

(対象物質濃度範囲：5.00~200 ng/mL (左図)、5.00~20.0 ng/mL (右図))

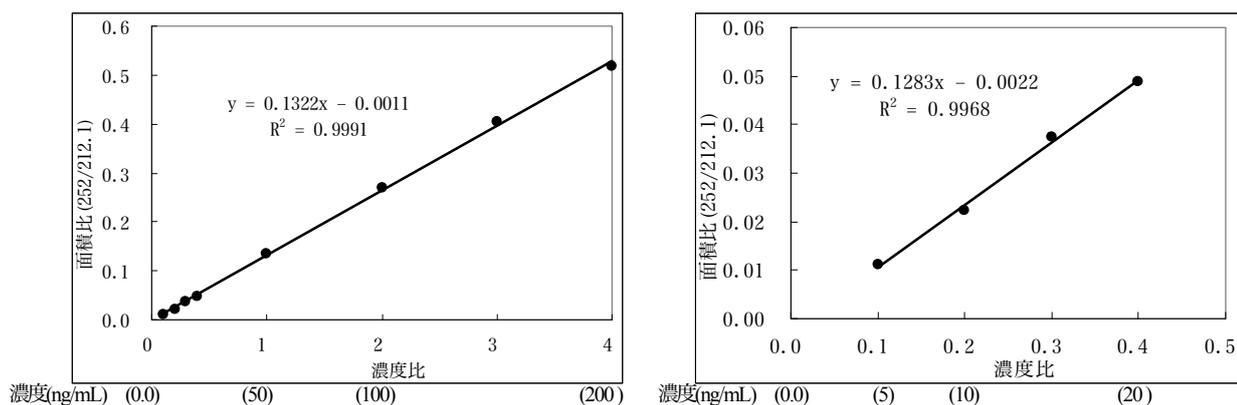


図6-4 *p*-フェニレンジアミン検量線（内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀ 50.0 ng/mL）
 （対象物質濃度範囲：5.00～200 ng/mL（左図）、5.00～20.0 ng/mL（右図））

表5-1 検量線作成用データ一覧

（*o*-フェニレンジアミン、サロゲート物質：*o*-フェニレンジアミン-3,4,5,6-*d*₄）

| 標準液濃度 (ng/mL) | 応答値 | | 応答比 |
|------------------|--|---|--------|
| | <i>o</i> -フェニレンジアミン (<i>m/z</i> = 206) | <i>o</i> -フェニレンジアミン-3,4,5,6- <i>d</i> ₄ (<i>m/z</i> = 210) | |
| 200 | 2010240 | 918246 | 2.1892 |
| 150 | 1679028 | 1021064 | 1.6444 |
| 100 | 987050 | 907705 | 1.0874 |
| 50.0 | 518068 | 915488 | 0.5659 |
| 20.0 | 212080 | 959564 | 0.2210 |
| 15.0 | 157414 | 951855 | 0.1654 |
| 10.0 | 90763 | 813190 | 0.1116 |
| 5.00 | 50401 | 923979 | 0.0545 |

表5-2 検量線作成用データ一覧

（*o*-フェニレンジアミン、内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀）

| 標準液濃度 (ng/mL) | 応答値 | | 応答比 |
|------------------|--|--|--------|
| | <i>o</i> -フェニレンジアミン (<i>m/z</i> = 206) | フルオランテン- <i>d</i> ₁₀ (<i>m/z</i> = 212.1) | |
| 200 | 2010240 | 4660829 | 0.4313 |
| 150 | 1679028 | 4928052 | 0.3407 |
| 100 | 987050 | 4725339 | 0.2089 |
| 50.0 | 518068 | 4588729 | 0.1129 |
| 20.0 | 212080 | 4994694 | 0.0425 |
| 15.0 | 157414 | 4918895 | 0.0320 |
| 10.0 | 90763 | 4410451 | 0.0206 |
| 5.00 | 50401 | 4778254 | 0.0105 |

表 5-3 検量線作成用データ一覧
(*m*-フェニレンジアミン、内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀)

| 標準液濃度 (ng/mL) | 応答値 | | 応答比 |
|------------------|--|--|--------|
| | <i>m</i> -フェニレンジアミン (<i>m/z</i> = 252) | フルオランテン- <i>d</i> ₁₀ (<i>m/z</i> = 212.1) | |
| 200 | 2672011 | 4660829 | 0.5733 |
| 150 | 2177490 | 4928052 | 0.4419 |
| 100 | 1313403 | 4725339 | 0.2779 |
| 50.0 | 622779 | 4588729 | 0.1357 |
| 20.0 | 245060 | 4994694 | 0.0491 |
| 15.0 | 174878 | 4918895 | 0.0356 |
| 10.0 | 97338 | 4410451 | 0.0221 |
| 5.00 | 50737 | 4778254 | 0.0106 |

表 5-4 検量線作成用データ一覧
(*p*-フェニレンジアミン、内標準物質：フルオランテン-*d*₁₀)

| 標準液濃度 (ng/mL) | 応答値 | | 応答比 |
|------------------|--|--|--------|
| | <i>p</i> -フェニレンジアミン (<i>m/z</i> = 252) | フルオランテン- <i>d</i> ₁₀ (<i>m/z</i> = 212.1) | |
| 200 | 2412659 | 4660829 | 0.5176 |
| 150 | 1994319 | 4928052 | 0.4047 |
| 100 | 1268084 | 4725339 | 0.2684 |
| 50.0 | 618304 | 4588729 | 0.1347 |
| 20.0 | 243697 | 4994694 | 0.0488 |
| 15.0 | 183615 | 4918895 | 0.0373 |
| 10.0 | 98422 | 4410451 | 0.0223 |
| 5.00 | 52690 | 4778254 | 0.0110 |

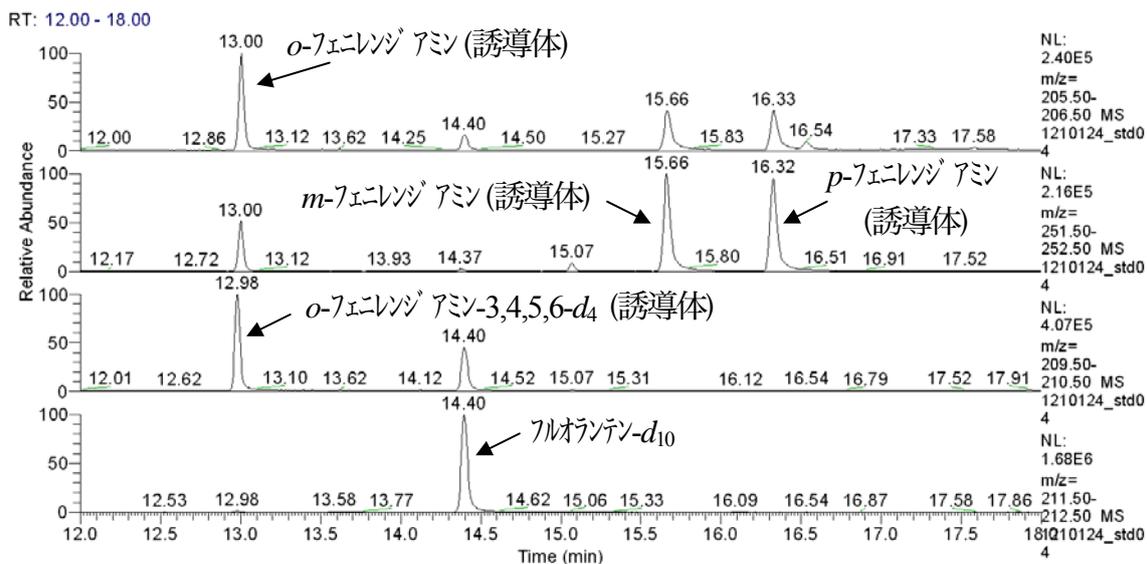


図7 検量線用標準液のクロマトグラム (50.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

フェニレンジアミンと *o*-フェニレンジアミン-3,4,5,6-*d*₄ の誘導体のマススペクトル、及びフルオランテン-*d*₁₀ のマススペクトルを示す (図8)。

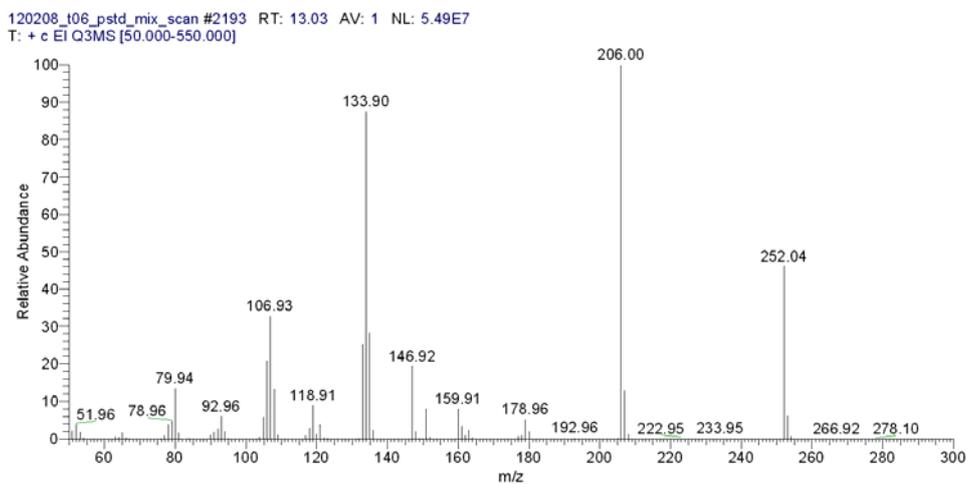


図8-1 *o*-フェニレンジアミン誘導体のマススペクトル

120208_t06_pstd_mix_scan #2920 RT: 15.69 AV: 1 NL: 6.18E7
T: + c EI Q3MS [50.000-550.000]

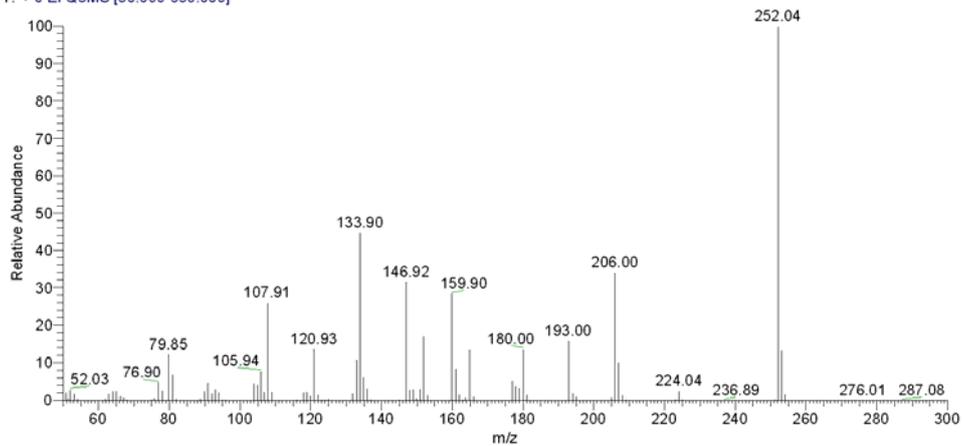


図8-2 *m*-フェニレンジアミン誘導体のマススペクトル

120208_t06_pstd_mix_scan #3101 RT: 16.35 AV: 1 NL: 5.38E7
T: + c EI Q3MS [50.000-550.000]

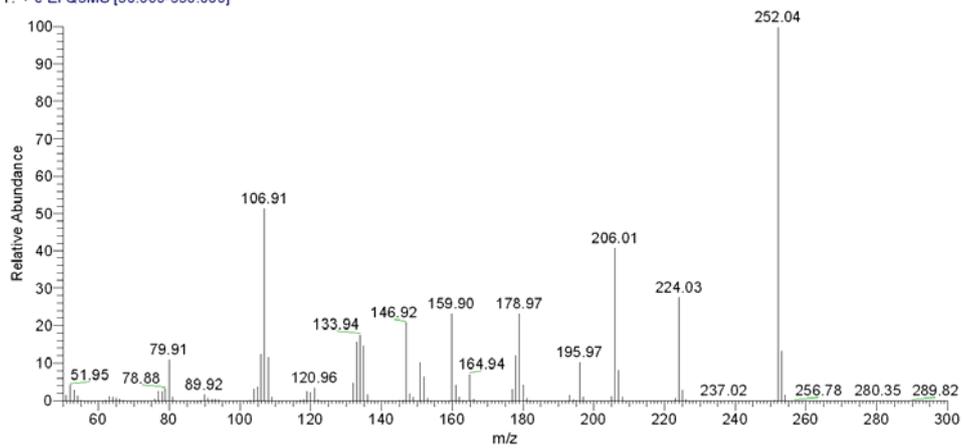


図8-3 *p*-フェニレンジアミン誘導体のマススペクトル

111013_d_scan01 #2200 RT: 13.10 AV: 1 NL: 6.28E6
T: + c EI Q3MS [50.000-550.000]

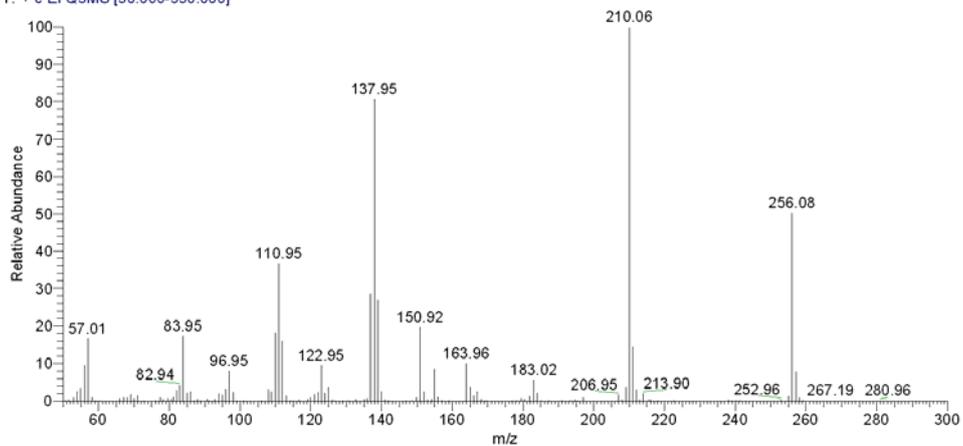


図8-4 *o*-フェニレンジアミン-3,4,5,6-*d*₄ 誘導体のマススペクトル

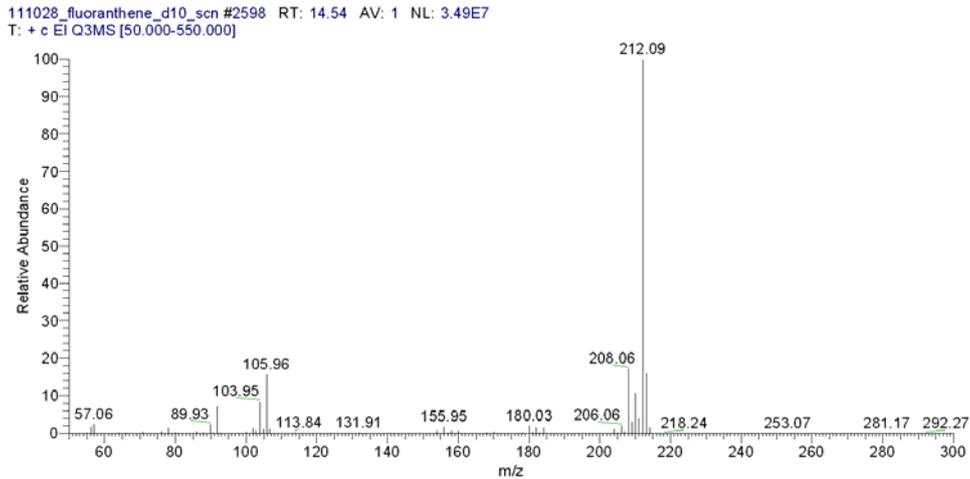


図8-5 フルオランテン-d₁₀のマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランク試験のSIMクロマトグラム（図9）を示す。いずれの物質についても操作ブランクは検出されなかった。

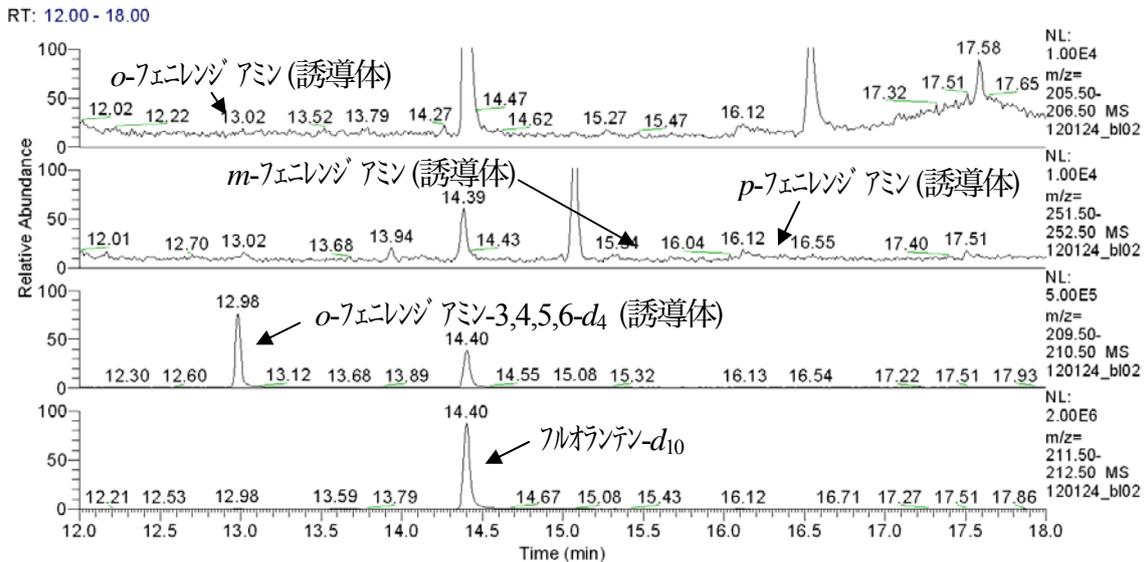


図9 操作ブランクのSIMクロマトグラム

〔添加回収試験〕

添加回収試験の結果を表6に示す。また、クロマトグラムを図10に示す。河川水は裾花川、海水は直江津港で採取したものをを使用した。

表6 添加回収試験結果

| 試料名 | 物質名 | 試料量 (mL) | 添加量 (ng) | 試験数 | 検出濃度 (ng/L) | 回収率 (%) | ターゲット回収率 (%) | 変動係数(%) |
|-----|---------------------|----------|----------|-----|-------------|---------|--------------|---------|
| 河川水 | <i>o</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 2 | ND | - | 86 | - |
| | ジアミン | 100 | 5 | 7 | 47.3 | 95 | 91 | 4.3 |
| | <i>m</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 2 | ND | - | - | - |
| | ジアミン | 100 | 5 | 7 | 50.3 | 101 | - | 3.9 |
| | <i>p</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 2 | ND | - | - | - |
| | ジアミン | 100 | 5 | 7 | 20.2 | 40 | - | 12 |
| 海水 | <i>o</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 1 | ND | - | 96 | - |
| | ジアミン | 100 | 100 | 5 | 974 | 97 | 100 | 0.9 |
| | <i>m</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 1 | ND | - | - | - |
| | ジアミン | 100 | 100 | 5 | 951 | 95 | - | 3.5 |
| | <i>p</i> -フェニレンジアミン | 100 | 無添加 | 1 | ND | - | - | - |
| | ジアミン | 100 | 100 | 5 | 990 | 99 | - | 4.1 |

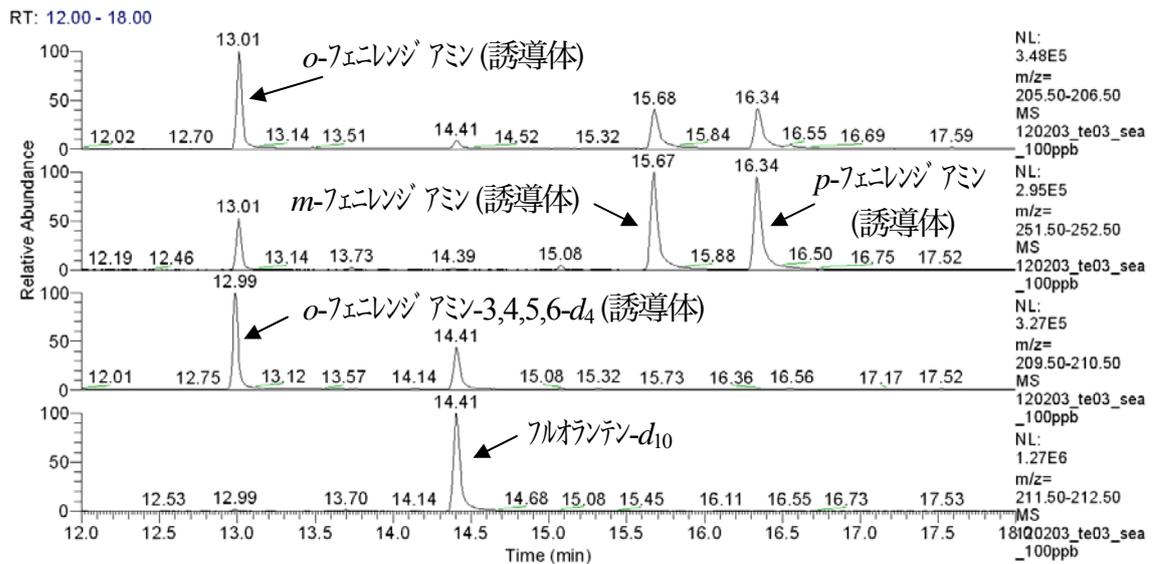


図10 添加回収試験のSIMクロマトグラム (海水) (添加: 0.1 μg)

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果 (初期濃度: 1 ng/mL) を表7に示す (酸化防止剤の添加なし)。酸性条件での検討の場合のみ誘導体化時の炭酸水素ナトリウムの添加量を 8 g とした。酸性条件下ではほとんど分解した。中性、塩基性条件下でも半分程度が分解した。また、中性条件下ではばらつきが大きかった。

表7 分解性スクリーニング試験結果

| pH | 試験数 | 1時間後の残存率 (%) | | | 7日後の残存率 (%) | | | | | |
|----|-----|--------------|----|----|-------------|----|----|----|----|----|
| | | o- | m- | p- | 暗所 | | | 明所 | | |
| | | | | | o- | m- | p- | o- | m- | p- |
| 5 | 1 | 86 | 58 | 8 | 0 | 27 | 0 | - | - | - |
| | 1 | 53 | 46 | 0 | 1 | 31 | 0 | - | - | - |
| 7 | 1 | 102 | 94 | 49 | 41 | 47 | 0 | 40 | 33 | 0 |
| | 1 | 104 | 96 | 45 | 88 | 84 | 0 | 75 | 45 | 0 |
| 9 | 1 | 104 | 95 | 9 | 56 | 91 | 0 | - | - | - |
| | 1 | 100 | 99 | 11 | 41 | 94 | 0 | - | - | - |

〔保存性試験〕

保存性試験の結果を表8に示す。湖水は諏訪湖湖心のもの、海水は直江津港のものを用いた。試料の保存は褐色瓶中5°Cで、抽出液は100倍濃縮し、バイアル中5°Cで保存した。亜硫酸ナトリウム及びEDTAを添加することで残存率が向上した。

表8-1 保存性試験結果 (0.1%亜硫酸ナトリウム溶液)

| 試料 | 試験数 | 試料名 | 物質 | 初期濃度 (µg/L) | 残存率(%) | | |
|-----|-----|-------------|-------------|----------------|--------|-----|-----|
| | | | | | 7日 | 14日 | 1ヶ月 |
| 湖水 | 2 | 試料 | o-7エニレンジアミン | 1 | 81 | 77 | - |
| | 2 | | m-7エニレンジアミン | 1 | 88 | 65 | - |
| | 2 | | p-7エニレンジアミン | 1 | 0 | 0 | - |
| | 2 | 粗抽出液 | o-7エニレンジアミン | 100 | - | 98 | - |
| | 2 | | m-7エニレンジアミン | 100 | - | 104 | - |
| | 2 | | p-7エニレンジアミン | 100 | - | 113 | - |
| 海水 | 2 | 試料 | o-7エニレンジアミン | 1 | 11 | 2 | - |
| | 2 | | m-7エニレンジアミン | 1 | 35 | 24 | - |
| | 2 | | p-7エニレンジアミン | 1 | 0 | 0 | - |
| | 2 | 粗抽出液 | o-7エニレンジアミン | 100 | - | 98 | - |
| | 2 | | m-7エニレンジアミン | 100 | - | 101 | - |
| | 2 | | p-7エニレンジアミン | 100 | - | 109 | - |
| 標準液 | 2 | 標準原液 | o-7エニレンジアミン | 1000000 | - | 101 | 92 |
| | 2 | | m-7エニレンジアミン | 1000000 | - | 108 | 94 |
| | 2 | | p-7エニレンジアミン | 1000000 | - | 108 | 75 |
| | 5 | 検量線用 標準液 | o-7エニレンジアミン | 20~200 | - | 101 | - |
| | 5 | | m-7エニレンジアミン | 20~200 | - | 106 | - |
| | 5 | | p-7エニレンジアミン | 20~200 | - | 105 | - |

表 8-2 保存性試験結果 (0.1%チオ硫酸ナトリウム溶液)

| 試料 | 試験数 | 試料名 | 物質名 | 初期濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 残存率 | |
|-----|-----|------|----------------------|-----------------------------|-----|--|
| | | | | | 7日 | |
| 湖水 | 2 | 試料 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 5 | |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 65 | |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 0 | |
| 海水 | 1 | 試料 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 37 | |
| | 1 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 95 | |
| | 1 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 0 | |
| 標準液 | 2 | 標準原液 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 1000000 | 97 | |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 1000000 | 104 | |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 1000000 | 107 | |

表 8-3 保存性試験結果 (0.1%亜硫酸ナトリウム、0.1%EDTA 溶液)

| 試料 | 試験数 | 試料名 | 物質名 | 初期濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 残存率(%) | |
|-----|-----|-------------|----------------------|-----------------------------|--------|-----|
| | | | | | 7日 | 14日 |
| 湖水 | 2 | 試料 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 98 | 92 |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 100 | 91 |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 18 | 12 |
| | 2 | 粗抽出液 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 95 |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 101 |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 106 |
| 海水 | 2 | 試料 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 101 | 96 |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 107 | 91 |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 1 | 68 | 53 |
| | 2 | 粗抽出液 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 97 |
| | 2 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 103 |
| | 2 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 100 | - | 105 |
| 標準液 | 5 | 検量線用 標準液 | <i>o</i> -7エニレンジ アミン | 20~200 | - | 96 |
| | 5 | | <i>m</i> -7エニレンジ アミン | 20~200 | - | 101 |
| | 5 | | <i>p</i> -7エニレンジ アミン | 20~200 | - | 103 |

〔環境試料の分析例〕

環境試料のクロマトグラムを図 11 に示す。いずれの物質も検出されなかった。

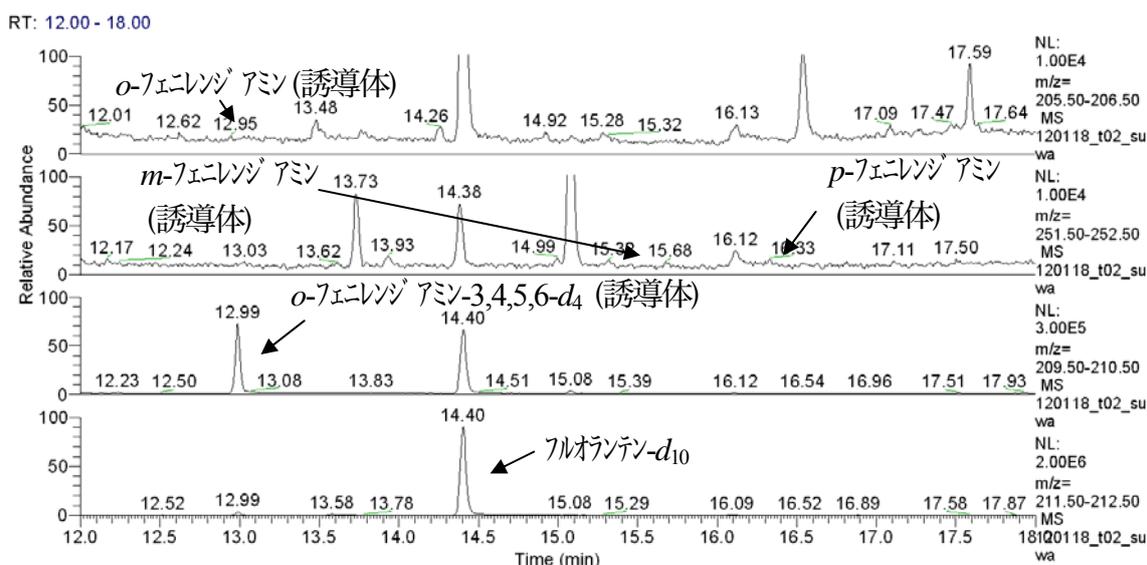


図 11-1 環境水のクロマトグラム (湖水)

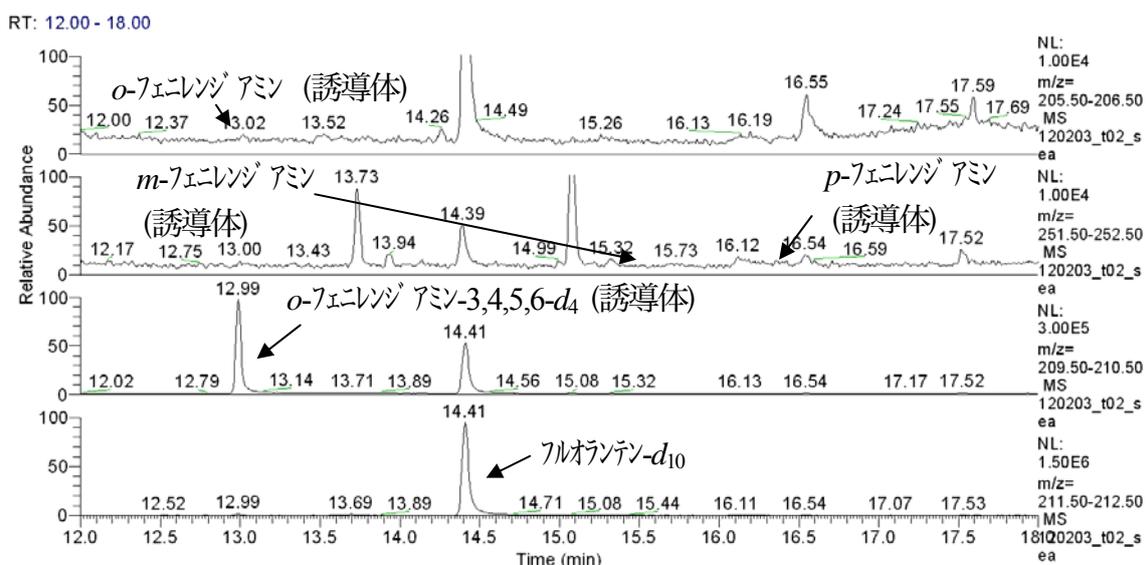


図 11-2 環境水のクロマトグラム (海水)

〔クリーンアップの検討〕

シリカゲルカートリッジを用いたクリーンアップの検討を行った。シリカゲルカートリッジは Sep-Pak®Plus Silica cartridge (690 mg) 及び SUPELCO Supelclean LC-Si (500 mg) を用いた。

Sep-Pak®Plus Silica cartridge を用いた場合、プラスチックホルダーの影響と思われる妨害物質が溶出したため、LC-Si による検討のみを行った。

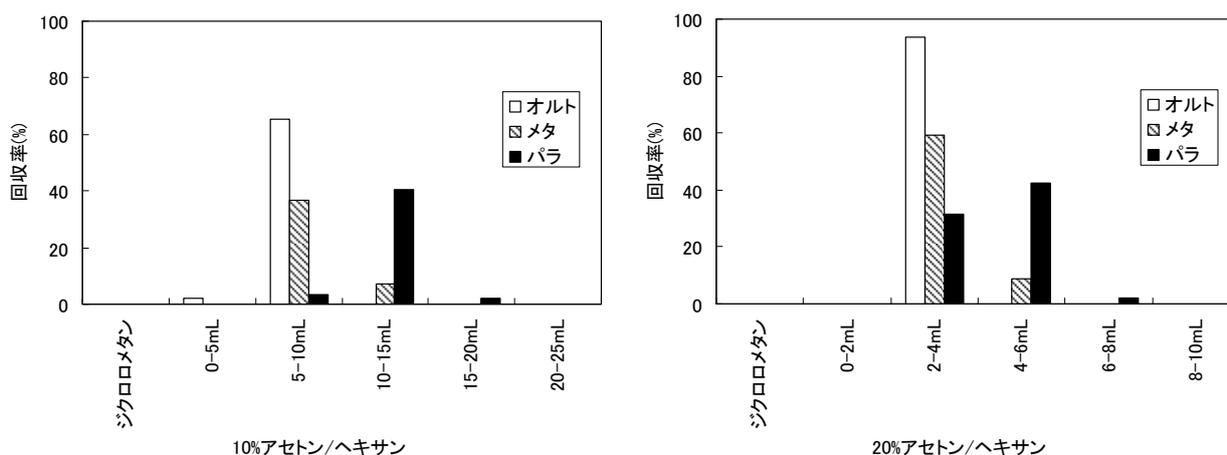


図12 SUPELCO Supelclean LC-Si による溶出パターン (n=2 の平均値)

ジクロロメタン 5 mL ではオルト、メタ、パラ誘導体のいずれも溶出してこないため、ジクロロメタンを流して妨害物質等を除去した後に 20%アセトン/ヘキサン 10 mL で溶出させることが可能。10%アセトン/ヘキサンを用いた場合は回収率が低く、多くの溶媒を使用するため時間もかかった。

〔誘導体化方法の検討〕

〈クロロギ酸エチル添加量の検討〉

100 mL の精製水に対して 100 ng の *o*-フェニレンジアミンと NaOH を添加し、図 13 に示した量のクロロギ酸エチルを加えた。溶液が酸性にならないようにするため、クロロギ酸エチルの添加量が 0.1、0.2、0.5 mL の場合は 0.2%、1.0 mL の場合は 0.4%、1.5 mL の場合は 0.6% となるように NaOH を添加した。0.5 mL 以上添加しても回収率が頭打ちとなり、また、添加量を増やすことでクロロギ酸エチル由来の夾雑物が増加するため、クロロギ酸エチルの添加量を 0.5 mL とした。

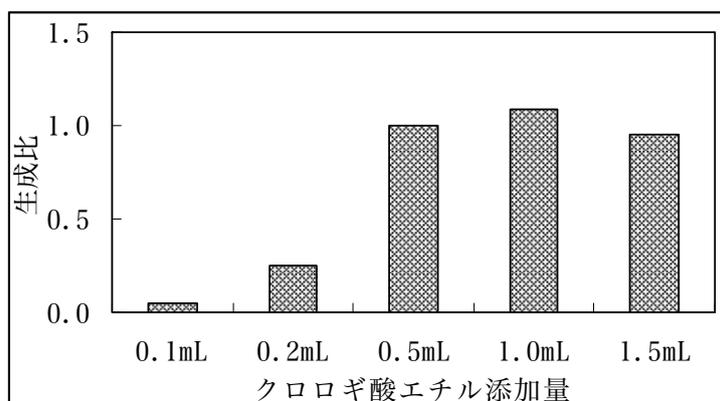


図13 クロロギ酸エチル添加量に対する *o*-フェニレンジアミン誘導体の生成比 (0.5 mL 添加時の面積比 (対象物質/内標準物質) を 1 とした)

〈塩基の検討〉

①NaOH を塩基として用いた場合の濃度の検討

最適の塩基濃度を見出すため、100 mL の精製水に対して 100 ng の *o*-フェニレンジアミンと図 14-1 に示した濃度の NaOH、及び 1.0 mL のクロロギ酸エチルを添加した。NaOH 濃度が大きいほど回収率は低下した。

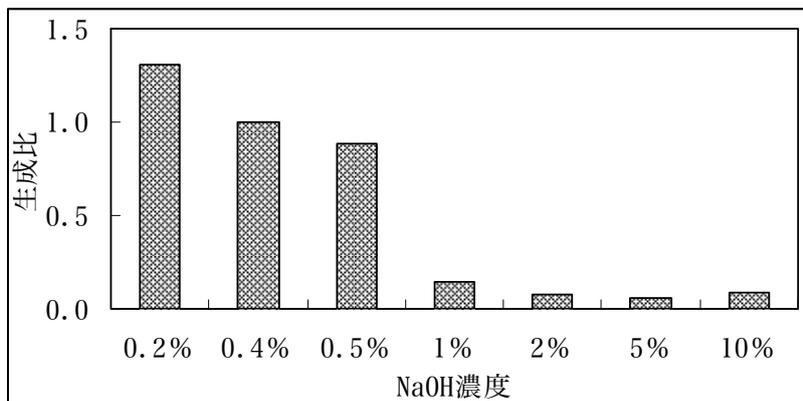


図 14-1 NaOH 濃度に対する *o*-フェニレンジアミン誘導体の生成比 (NaOH 濃度 0.4% の場合の面積比 (対象物質/内標準物質) を 1 とした)

②塩基の種類、濃度の検討

①の検討から pH が大きいと回収率が低下すると考えられ、弱塩基の使用が効果的であると推測された。そこで、弱塩基の種類及び濃度の検討を行った。精製水 100 mL に *o*-フェニレンジアミン 100 ng を添加し、クロロギ酸エチル 0.5 mL と図 14-2 に示した種類及び濃度の塩基を加え、回収率の検討を行った。K₂CO₃ に比べ NaHCO₃ は回収率がよく、NaHCO₃ 濃度が 4~10% でほぼ一定の回収であった。NaHCO₃ は濃度が高いほど回収率はよくなる傾向が見られた。①の結果と合わせ、回収率と塩基の溶解性を考慮し、5%NaHCO₃ を最適条件とした。

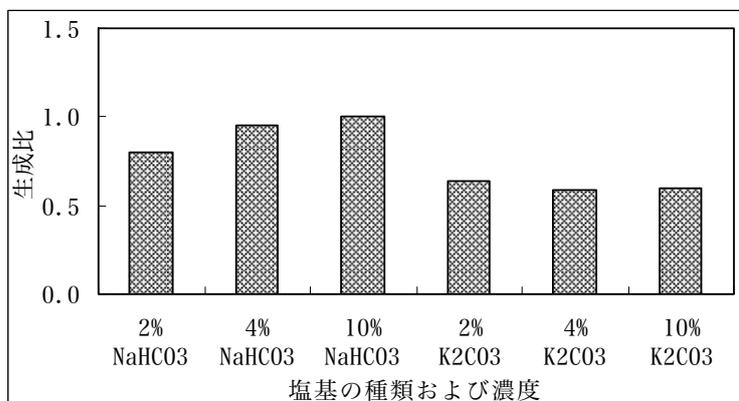


図 14-2 塩基の種類と濃度に対する *o*-フェニレンジアミン誘導体の生成比 (4%炭酸水素ナトリウム添加時の面積比 (対象物質/内標準物質) を 1 とした)

〈反応時間の検討〉

精製水 100 mL に *o*-フェニレンジアミンを 100 ng 添加し、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に示した方法で振とう時間を変えて回収率の変化を調べた（ただし、サロゲートは添加せず、内標準には *p*-ターフェニル-*d*₁₄ を用いた）。表 9 のとおり、反応時間による差はあまりなく、長くするとかえって回収率が悪くなる傾向がみられ、クロロギ酸エチル添加後直ちに反応が完結していると考えられた。

表 9 反応時間ごとの回収率

| 反応時間 (min) | 回収率 (%) |
|------------|---------|
| 5 | 101 |
| 15 | 102 |
| 30 | 93 |
| 60 | 84 |

〈誘導体の合成と誘導体化率の算出〉

注解の（注 8）に示した方法で誘導体の合成と精製を行い、誘導体化率の算出を行ったところ、*o*-フェニレンジアミンの誘導体化率は 102%（平均値、*n*=2）であり、定量的に誘導体化されていることがわかった。

同様に *m*、*p*-フェニレンジアミン誘導体の合成を試みたが、誘導体合成時に生成する副生成物の分離ができなかった。副生成物のマススペクトルには *m/z*=252 のイオンは観測されなかったが、*m/z*=206 や 160 などのピークは観測された。

〈ピーク形状に関する PEG 添加の効果〉

20 ng/mL の検量線用標準液とそれに PEG200 を 100 µg/mL となるように添加したものをそれぞれ測定し、ピークの形状を比較した。*o*-フェニレンジアミンについてはピークの形状にほとんど違いはなかったが、*m*、*p*-フェニレンジアミンについてはテーリングが改善され、感度も向上した。

RT: 15.50 - 16.50

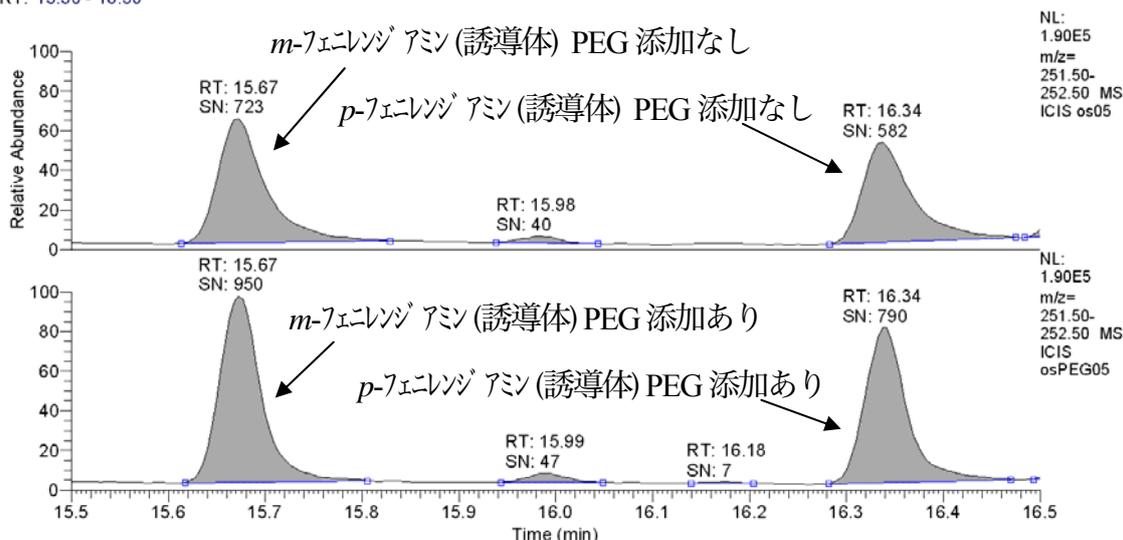


図 15 PEG 添加の有無によるピーク形状の違い

【評価】

本法は水質試料中の *o*-フェニレンジアミンの定量が可能であり、MDL 及び MQL は 7.9 ng/L 及び 20 ng/L である。検量線は 5.00~200 ng/mL の濃度範囲で直線性が確認された ($R^2=0.9999$)。亜硫酸ナトリウム及び EDTA の添加により回収率が向上し、河川水及び海水を用いた添加回収試験の平均回収率はそれぞれ 95%、97% (サロゲート回収率は 91%、100%) であった。また、環境試料から *o*-フェニレンジアミンは検出されなかった。さらに、本法は *m*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミンを含めた同時分析に適用が可能である。フェニレンジアミンの分析では対象物質の酸化分解を防ぐことが重要であり、酸化防止剤の添加や速やかな分析が必要である。

【参考文献】

- 1) 東レリサーチセンター：誘導体化 GC 法によるアミン、グリコールの微量定量 http://www.toray-research.co.jp/jirei/industrialmaterial/ind_d004.html
- 2) 大阪市：含窒素化合物 (その II), pp1307-1314, 「化学物質分析法開発調査報告書総覧 (昭和 49 年度~平成元年度)」, 環境庁環境保健部保健調査室, (1991)
- 3) 大阪市：トルイレンジアミン、フェニレンジアミン, pp1137-1142, 「化学物質分析法開発調査報告書総覧 (昭和 49 年度~平成元年度)」, 環境庁環境保健部保健調査室, (1991)
- 4) 大阪市：フェニレンジアミン、ジアミノトルエン, pp50-56, 「化学物質分析法開発調査報告書総覧 (昭和 49 年度~平成元年度)」, 環境庁環境保健部保健調査室, (1991)

【担当者連絡先】

所属先名称 : 長野県環境保全研究所

所属先住所 : 〒380-0944 長野県長野市安茂里米村 1978

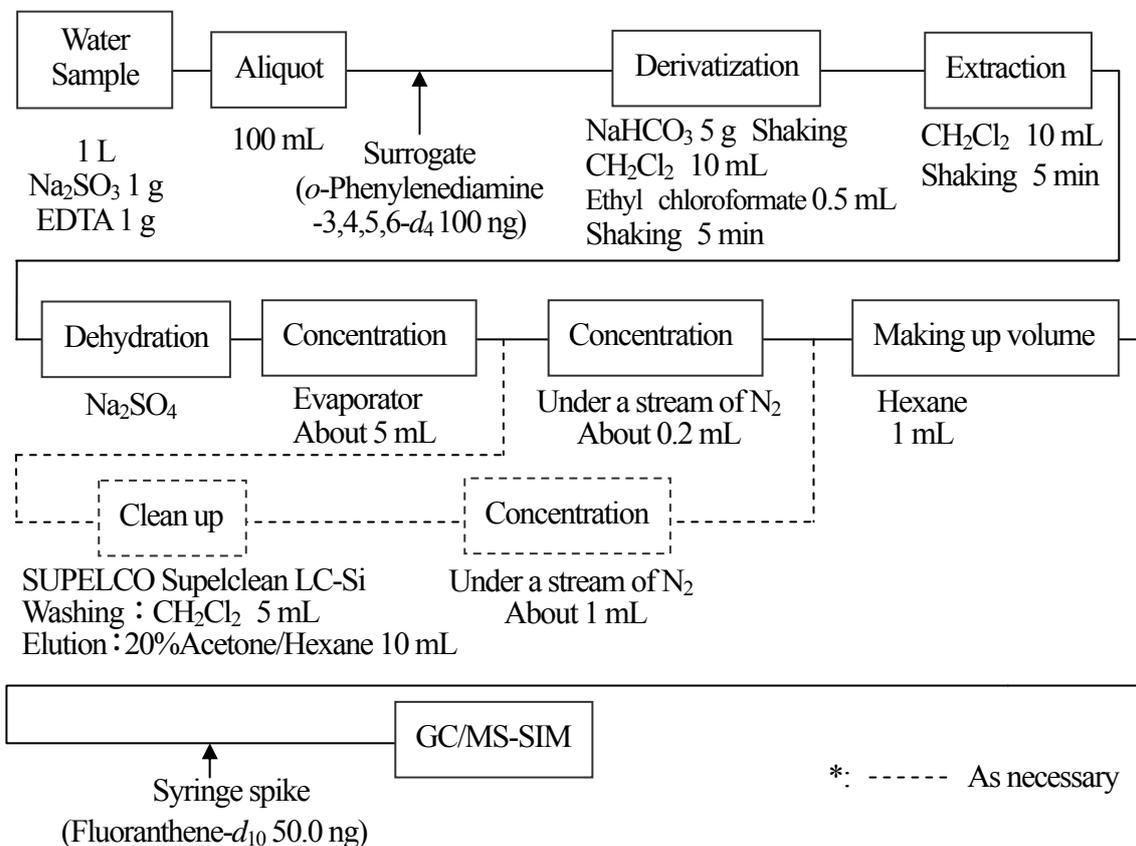
Tel : 026-227-0354 Fax : 026-224-3415

担当者氏名 : 宮坂真司、吉田富美雄、笹井春雄

E-mail : kanken-mizu@pref.nagano.lg.jp, miyasaka-shinji-r@pref.nagano.lg.jp

o-Phenylenediamine

A novel method for the determination of *o*-phenylenediamine in water samples has been developed employing gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring (GC/MS-SIM). As antioxidants, both 0.1% sodium sulfite and 0.1% disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) are added to a water sample immediately after sampling, and dissolved by shaking the sampling bottle. A surrogate (*o*-phenylenediamine-3,4,5,6-*d*₄, 100 ng) is spiked into a 100 mL of water sample, and 5 g of sodium hydrogen carbonate is added and dissolved. Then 10 mL of dichloromethane and 0.5 mL of ethyl chloroformate are added and shaken for 5 min. Derivatized *o*-phenylenediamine is extracted twice with 10 mL of dichloromethane. The extract is dehydrated with anhydrous sodium sulfate and concentrated using a rotary evaporator. As necessary, the extract is cleaned up with a silica-gel cartridge. The extract is concentrated to about 0.2 mL under a stream of N₂ gas and diluted to 1 mL with hexane. Then 50.0 ng of fluoranthene-*d*₁₀ is spiked into the extract as an internal standard. The concentration of *o*-phenylenediamine is determined by GC/MS-SIM. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) of this method are 7.9 ng/L and 20 ng/L, respectively. The average recoveries of *o*-phenylenediamine added to river water samples and seawater samples were 95% and 97%, respectively (those of the surrogate were 91% and 100%). Using this method, *o*-phenylenediamine was not detected from either river water or seawater. It is also possible to determine the concentrations of *m*-phenylenediamine and *p*-phenylenediamine using this method.



| 物質名 | 分析法フローチャート | 備考 |
|--|---|---|
| <p>[1] o-7エニレンジアミン</p> <p>[2] m-7エニレンジアミン</p> <p>[3] p-7エニレンジアミン</p> | <p>【水質】</p> <p>水質試料 1 L Na₂SO₃ 1 g EDTA 1 g</p> <p>分取 100 mL</p> <p>カゲート添加 (o-7エニレンジアミン-3,4,5,6-d₄ 100 ng)</p> <p>誘導体化 NaHCO₃ 5 g 振とう CH₂Cl₂ 10 mL クロロギ酸エチル 0.5 mL 振とう 5 min</p> <p>溶媒抽出 CH₂Cl₂ 10 mL 振とう 5 min</p> <p>脱水 無水 Na₂SO₄</p> <p>濃縮 エポレーター 約 5 mL まで</p> <p>濃縮 窒素気流下 約 0.2 mL</p> <p>定容 ヘキサン 1 mL</p> <p>GC/MS-SIM</p> <p>クリーンアップ SUPELCO Supelclean LC-Si 洗浄: CH₂Cl₂ 5 mL 溶出: 20%アセトン/ヘキサン 10 mL</p> <p>濃縮 窒素気流下 約 1 mL</p> <p>シジメス[®]添加 (7-フルオロアセトン-d₁₀ 50.0 ng)</p> <p>*: ----- は必要に応じて実施</p> | <p>分析原理: GC/MS-SIM</p> <p>検出下限値: 【水質】(ng/L)</p> <p>[1] 7.9 [2] 7.5 [3] 9.6</p> <p>分析条件: 機器 GC: Thermo Trace GC Ultra MS: Thermo TSQ Quantum</p> <p>カラム: DB-17ms 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm</p> |