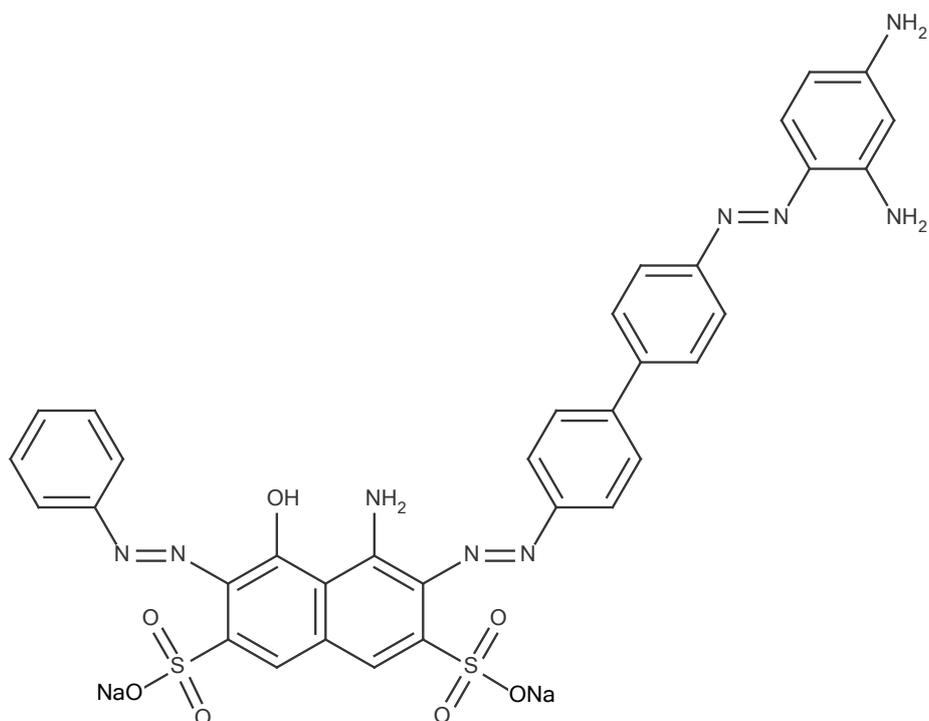


ジナトリウム=4-アミノ-3-[4'-(2,4-ジアミノフェニルアゾ)-1,1'-ビフェニル-4-イルアゾ]-5-ヒドロキシ-6-フェニルアゾ-2,7-ナフタレンジスルホナート

Disodium 4-amino-3-[[4'-[(2,4-diaminophenyl)azo][1,1'-biphenyl]-4-yl]azo]-5-hydroxy-6-(phenylazo)naphthalene-2,7-disulphonate

別名：ダイレクトブラック 38

【対象物質の構造】



CAS 番号：1937-37-7

分子式：C₃₄H₂₅N₉Na₂O₇S₂

【物理化学的性状】

[分子量] (平均質量) 781.7 (モノアイソトピック質量) 781.2967

[蒸気圧] 1.53E-36 mmHg (25°C 推定値¹⁾)

(2.03 hPa : 換算値 (1 mmHg = 1.33 hPa による))

[溶解性] 水 : 3000 mg/L (25°C 推定値¹⁾)

[log P_{ow}] 2.04 (計算値¹⁾)

【毒性、用途等】

[実験動物に対する急性毒性情報]

マウス (経口) LD₅₀ : 700 mg/kg²⁾

モルモット (経口) LD₅₀ : 1180 mg/kg²⁾

ラット (経口) LD₅₀ : 1500 mg/kg²⁾

[用途]

染料 臨床試薬, 循環血液量の測定³⁾

[適用法令]

化審法 第二種監視化学物質、官報公示整理番号 5-1370 通し番号 813

化管法 (PRTR 法) 第二種、政令番号 2-39

出典 :

- 1) Philip H. Howard, William M. Meylan, Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals
- 2) U.S. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Database
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) 調査

§1 分 析 法

(1) 分析法の概要

採水時にメタノールを添加した水質試料を固相カートリッジに通水して対象物質を捕集し、これをメタノールで溶出・濃縮後 LC/MS/MS-SRM (ESI-Negative) 法で定量する。

この分析法で、ジナトリウム=2,2'-ビニレンビス[5-(4-ホルホルノ-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 (注 1)) 及びナトリウム=3-(*N*-{4-[(4-{ジメチルアミノ}フェニル)(4-{*N*-エチル[(3-スルホナトフェニル)メチル]アミノ}フェニル)メチレン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン}-*N*-エチルアンモオ)ベンゼンスルホナート (別名 : アシッドバイオレット- 49 (注 2)) も

同時測定可能である。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ダイレクトブラック 38	: Acros Organics 製 純度 100% (商品名 : Chlorazol Black E, pure, certified)
フルオレスセント 260	: Ciba Specialty Chemicals 製 (商品名 : TINOPAL AMS-GX)
アシッドバイオレット-49	: 和光純薬工業製 試薬特級 純度 99% (商品名 : Acid Violet 6B)
アセトニトリル	: 和光純薬工業製 LC/MS 分析用
メタノール	: 和光純薬工業製 LC/MS 分析用
四ほう酸ナトリウム十水和物	: 和光純薬工業製 試薬特級
固相カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak Plus PS2
精製水	: Elix 純水製造装置 (ミリポア製) で製造した逆浸透水を採水口に LC-Pak を接続した Milli-Q 超純水装置 (ミリポア製) で処理したもの

【標準液の調製】

分析対象物質ダイレクトブラック 38 (DB38)、フルオレスセント 260 (F260)、アシッドバイオレット-49(AV49)をそれぞれ正確に 100 mg 量り取り、メタノールで 100 mL に定容しそれぞれの標準原液(1000 µg/mL)とする。

【検量線用標準液】

標準原液をメタノールで順次希釈して、検量線用混合標準液を調製する。検量線用標準液の各濃度は、5.00~200 ng/mL とする。

【器具】

コンセントレーター	: Waters 製 Concentrator Plus
注射筒(5 mL)	: 固相カートリッジからの溶出に使用
ポリプロピレン製容器	: 採取容器用(250 mL) (注 3)
メスシリンダー、メスフラスコ	

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

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。採取容器には、密栓できるポリプロピレン製の容器を用いて、予めメタノール50 mLを入れ重量を秤量しておく。この採取容器に水質試料量約100 mLを採取し、四ほう酸ナトリウム十水和物0.39 gを添加し容器ごと秤量後速やかに試験操作を行う（注3）。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料の全量（採取時添加したメタノールも含めて約150 mL）をコンディショニングした固相カートリッジ（注4）に10 mL/minで通水する（注5）。約10 mLの精製水で試料容器内を洗浄し、この洗浄水も試料を通した固相カートリッジに通す。固相カートリッジに精製水5 mLを通して洗浄後、注射筒で空気を10 mL通気して固相中の水分を除去する。その後、メタノール2 mLで溶出し、溶出液は窒素気流下で濃縮した後、メタノールで1 mLに定容し、試験液とする。

【空試験液の調製】

水質試料と同量の精製水に50 mLのメタノール及び四ほう酸ナトリウム十水和物0.39 gを添加した試料を用いて、【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】

【LC/MS/MS 測定条件】（注6）

[LC]

使用機器	: 1200 (Agilent 製)	
カラム	: Eclips Plus C-18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	
移動相	: A : 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ /H ₂ O B : CH ₃ CN	
	0→15 min	A : B = 70 : 30
	15→17 min	A = 70→5 B=30→95
	17→20 min	A : B = 5 : 95
	20→23 min	A = 5→70 B=95→30
	23→30 min	A : B = 70 : 30
カラム流量	: 0.2 mL/min	H25年度調査時、分析法のLC溶離条件では目的物質が溶出できず、大きな変更を要した事例があった。変更例: CH ₃ CN 0 2分30 60%、2 8分 60%。(2014年度精査等検討会コメント)
カラム温度	: 40°C	
試料注入量	: 5.0 μL	

[MS]

使用機器	: 6410 (Agilent 製)
ガス温度	: 340°C
ガス流量	: 5 L/min

脱溶媒温度 : 180°C
 ネブライザーガス圧 : 60 psi
 イオン化法 : ESI-Negative (イオンソースマルチモード)
 キャピラリー電圧 : 2500 V
 測定モード : SRM

モニターイオン(m/z)と測定条件

		プレカーサーイオン (m/z)*	プロダクトイオン (m/z)	フラグメント電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)**
DB38	定量	736.2	672.1	250	34
	確認		643.8		
	確認		631.3		
F260	定量	879.2	569.2	150	75
	確認		799.4		
	確認		648.9		
AV49	定量	710.2	630.1	280	36
	確認		540.4		
	確認		523.9		

*プレカーサーイオンの帰属 : DB38 (781.30-2Na+H=736.33),
F260 (924.40-2Na+H=879.439), AV49 (733.41-Na =710.42)

**コリジョンエネルギーの欄に表示されている単位(V)は、機器モニターに表示される単位であり、一般的な電圧の単位(V)ではない。

〔検量線〕

検量線用標準液 5.00 μ L を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた標準物質のピーク面積と標準物質の濃度から検量線を作成する。DB38 及び AV49 については、メインピークが 1 本観測されるだけであるが、F260 については、メインピークの前にピーク面積がメインピークの 4 割程度のピークが出現する。このため、F260 については、これら 2 本の面積の合算値を用いて検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 5.00 μ L を LC/MS/MS に注入する。検量線を用いて、得られたピーク面積より試験液中の濃度を測定する。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度 (ng/L) は次式により算出する。

水質試料中の濃度(ng/L) = 検出濃度(ng/mL) × 最終液量(mL) / 試料量(L)

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS (Agilent LC/MS/MS 6410)の IDL を下表に示す (注 7)。

表 1 IDL 算出の結果

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
DB38	1.9	100	1.00	19
F260	0.74	100	1.00	7.4
AV49	1.6	100	1.00	16

〔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 算出の結果

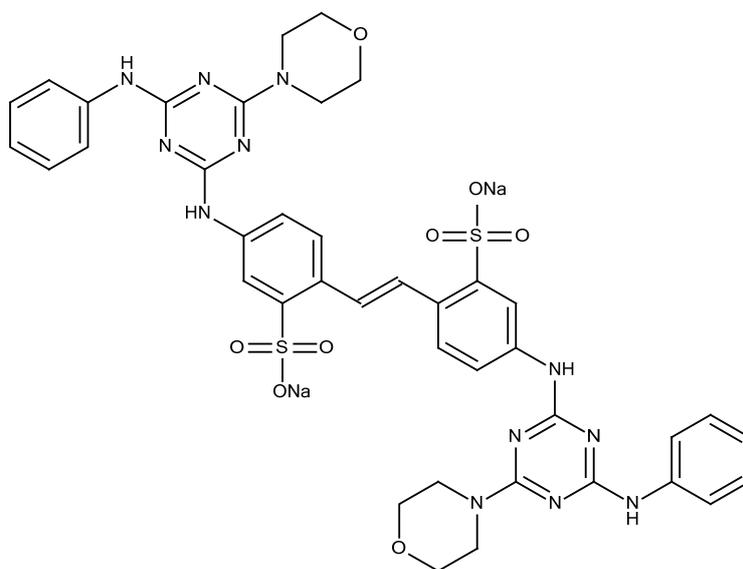
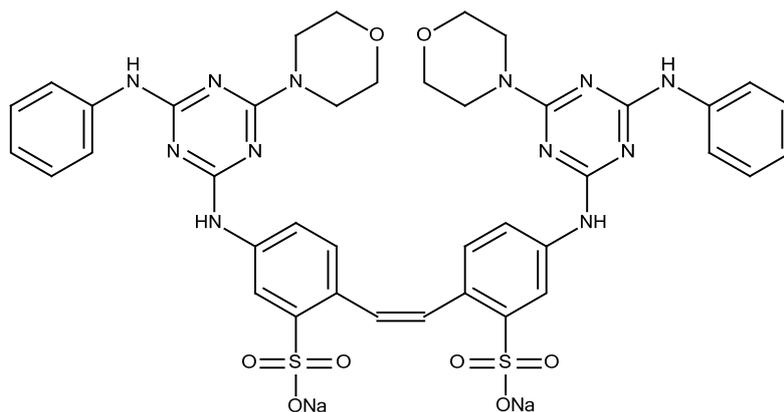
物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
DB38	100	1.00	27	70
F260	100	1.00	14	36
AV49	100	1.00	23	60

注 解

(注 1) フルオレスセント 260 の構造及び物理学的性状等を次に示す。

2,2'-(1,2-ethenediyl)bis[5-[[4-(4-morpholinyl)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]- Benzenesulfonic acid], disodium salt

別名： フルオレスセント 260



CAS 番号： 16090-02-1

分子式： $C_{40}H_{38}N_{12}Na_2O_8S_2$

[分子量] (平均質量) 924.93 (モノアイソトピック質量) 924.4023

[融点] $>270^{\circ}C$ ¹⁾

[溶解性] <1.9 g/L²⁾

[log Pow] 1.48³⁾

【毒性】

発がん性 2 IARC 2B 日本産業衛生学会 2B EU 3⁴⁾

毒性 2 甲殻類オオミジンコ 21 日間暴露 NOEC 0.42 mg/L⁵⁾

【用途】染料、増白剤⁶⁾

【適用法令】

化審法（平成 23 年 4 月 1 日から施行）既存、官報公示整理番号 5-2742

化管法（PRTR 法）（MSDS 制度対象）第一種、政令番号 1-199

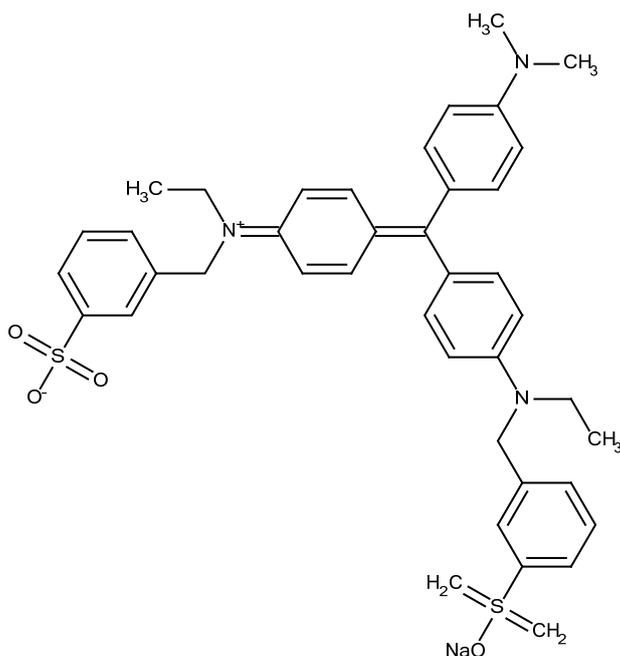
出典：

- 1) International Uniform Chemical Information Database IUCLID Data Set
- 2) Data from SRC PhysProp Database
- 3) Oxford University MSDS (Material Safety Data Sheet) Information
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)：化学物質管理分野化学物質総合情報提供システム(CHRIP)
- 5) 環境省「化学物質の生態影響試験 生態影響試験結果一覧」（平成 25 年 3 月版）
- 6) 独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)調査

(注 2)アシッドバイオレット-49 の構造及び物理学的性状等を次に示す。

[4-[[4-(dimethylamino)phenyl][4-[ethyl(3-sulphonatobenzyl)amino]phenyl]methylenecyclohexa-2,5-dien-1-ylidene](ethyl)(3-sulphonatobenzyl)ammonium,sodium salt

別名：アシッドバイオレット-49



CAS 番号：1694-09-3
分子式：C₃₉H₄₀N₃NaO₆S₂

[分子量] (平均分子量) 734.9 (モノアイソトピック質量) 733.4105

[融点] 245-250°C¹⁾

【毒性】発がん性 2 IARC 2B 日本産業衛生学会 2B EU 3²⁾

【用途】染料³⁾

【適用法令】

化審法 (平成 23 年 4 月 1 日から施行) 既存 2 監相当、官報公示整理番号 5-1611、第二種監視化学物質相当通し番号 819、

化管法 (PRTR 法) (MSDS 制度対象) 第二種、政令番号 2-67

出典 :

- 1) Oxford University MSDS (Material Safety Data Sheet) Information
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) : 化学物質管理分野化学物質総合情報提供システム(CHRIP)
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)調査

(注 3) 採水容器は、一般的なポリプロピレン製 250 mL で良い。

メタノールを添加しないと DB38 は、24 時間以内に河川水中で 90%、海水中で 50%消失する。また、DB38 は酸性の試料中でさらに消失しやすいため、試料採取時に四ほう酸ナトリウム十水和物を添加する (添加後 pH 9)。同時分析する F260 及び AV49 は、pH 9 に調整した環境試料中での分解は認められなかった (表 11)。

(注 4) メタノール 10 mL を通水した後、精製水 10 mL を通す。

(注 5) 通水中に気泡が混入すると分析目的物質の回収率が 60%程度まで低下するので注意が必要である。空試験液 (精製水 100 mL にメタノール 50 mL を加え、四ほう酸ナトリウム十水和物 0.39 g を添加して固相カートリッジに通水) を調製する際、試料流路接続部等において気泡が生じないことを確認すると良い。

(注 6) LC/MS/MS の条件は、本測定に使用した機種特有のものである。

(注 7) 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、表 3 のとおり算出した。図 1 に IDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 3 IDL の算出結果

物質名	DB38	F260	AV49
試料量 (L)	0.100	0.100	0.100
最終液量(mL)	1.00	1.00	1.00
注入量濃度 (ng/mL)	10.0	5.0	5.0
装置注入量(μL)	5.0	5.0	5.0
結果 1 (ng/mL)	8.77	5.42	5.22
結果 2 (ng/mL)	8.25	5.32	4.52
結果 3 (ng/mL)	9.53	5.27	5.13
結果 4 (ng/mL)	9.40	5.23	4.22
結果 5 (ng/mL)	8.67	5.07	4.22
結果 6 (ng/mL)	9.53	4.84	4.57
結果 7 (ng/mL)	9.25	5.27	4.93
平均値 (ng/mL)	9.057	5.204	4.686
標準偏差 (ng/mL)	0.50	0.19	0.41
IDL (ng/mL)*	1.9	0.74	1.6
IDL 試料濃度換算 (ng/L)	19	7.4	16
S/N 比	8	29	9
CV (%)	5.5	3.7	8.8

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

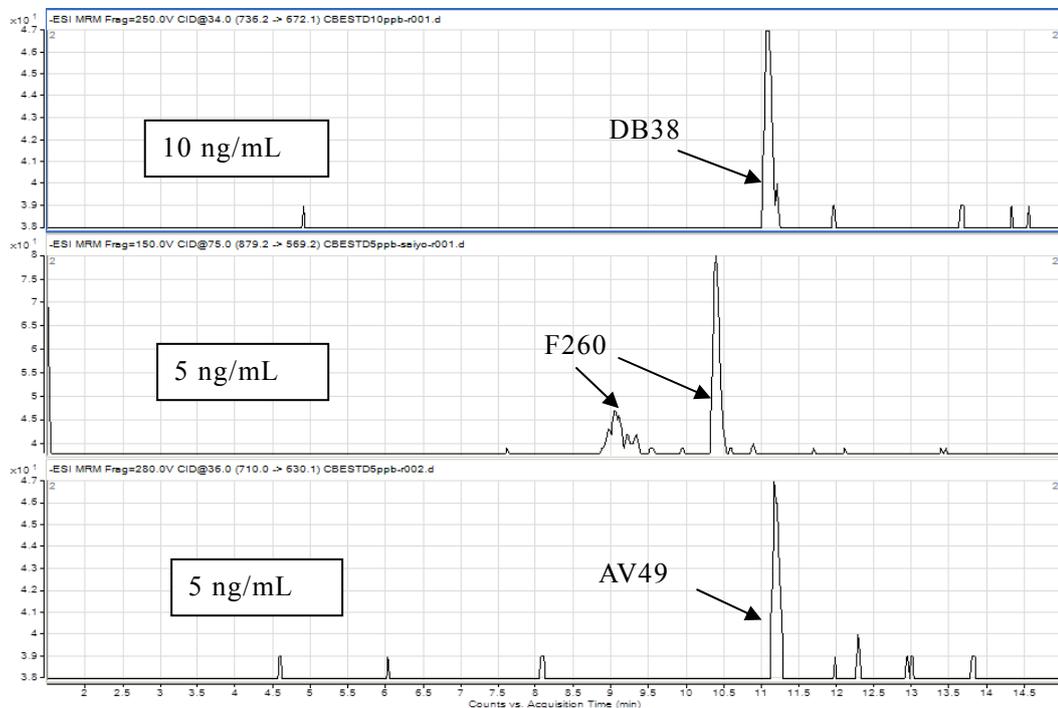


図 1 IDL 算出時のクロマトグラム

(注 8) 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、表 4 のとおり算出した。図 2 に MDL 測定時のクロマトグラムを示す。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	DB38	F260	AV49
試料	三陸海岸大槌湾海水		
試料量 (L)	0.10	0.10	0.10
標準添加量(ng)	20.0	5.0	7.0
試料換算濃度(ng/L)	200	50.0	70.0
最終液量(mL)	1.00	1.00	1.00
注入量濃度(ng/mL)	20.0	5.00	7.00
装置注入量(μL)	5.0	5.0	5.0
操作ブランク平均(ng/L)	ND	ND	ND
無添加平均(ng/L)	ND	ND	ND
結果 1 (ng/L)	207	51.7	62.7
結果 2 (ng/L)	193	53.2	58.5
結果 3 (ng/L)	213	47.4	65.1
結果 4 (ng/L)	205	44.7	61.8
結果 5 (ng/L)	200	49.8	63.9
結果 6 (ng/L)	212	43.6	71.9
結果 7 (ng/L)	203	46.4	75.6
平均値 (ng/L)	204.7	48.10	65.64
標準偏差 (ng/L)	6.95	3.58	6.02
MDL (ng/L)	27	14	23
MQL (ng/L)	70	36	60
S/N 比	18	27	14
CV (%)	3.4	7.4	9.2

*1: 操作ブランク平均: 試料マトリ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 = 3)

*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 = 3)

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

*4: MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

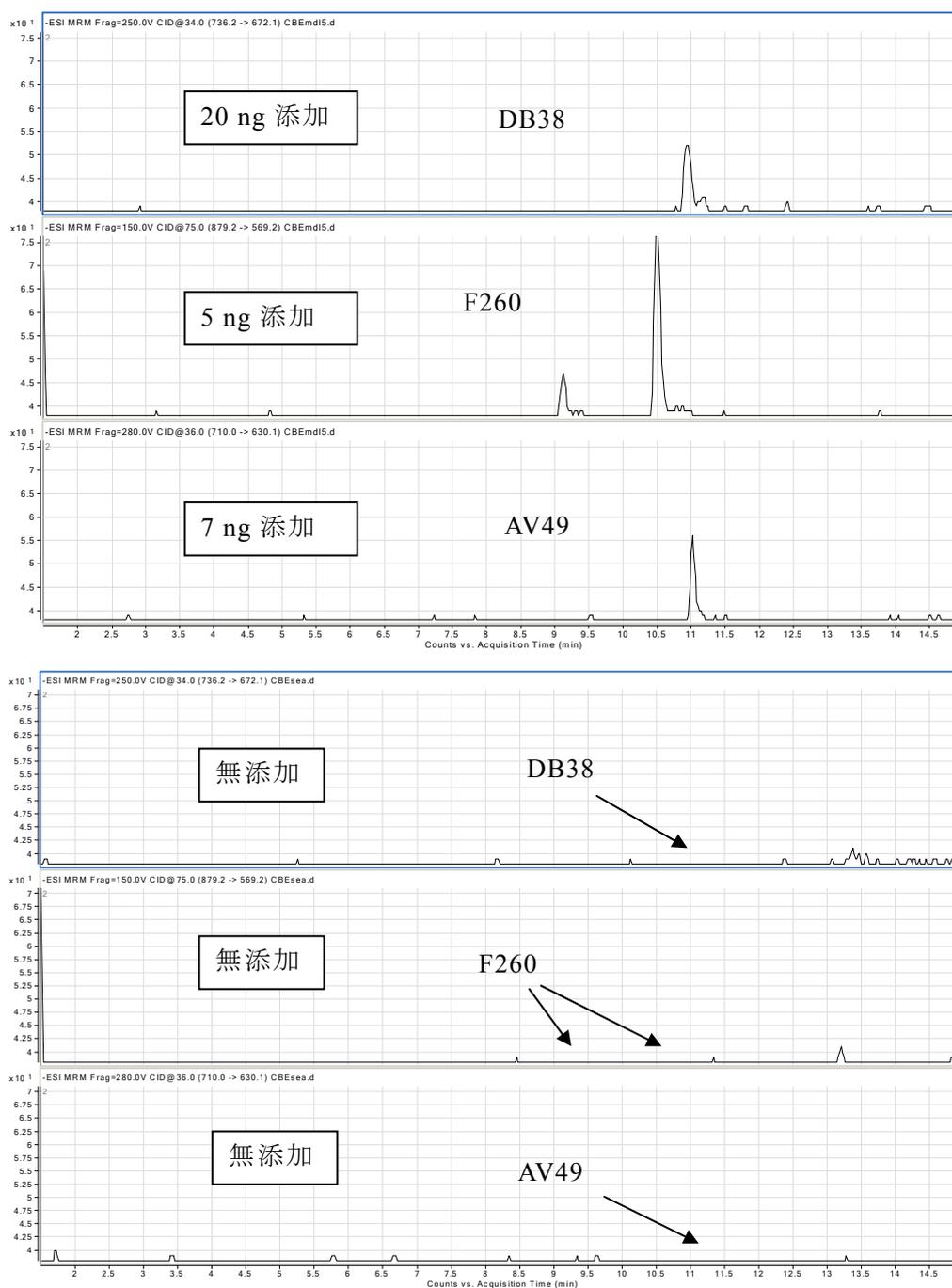


図2 MDL測定時のクロマトグラム

上3段：大槌湾海水 100 mL に DB38 を 20 ng、F260 を 5 ng、AV49 を 7 ng 添加したクロマトグラム
 下3段：無添加大槌湾海水クロマトグラム

§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3に示す。

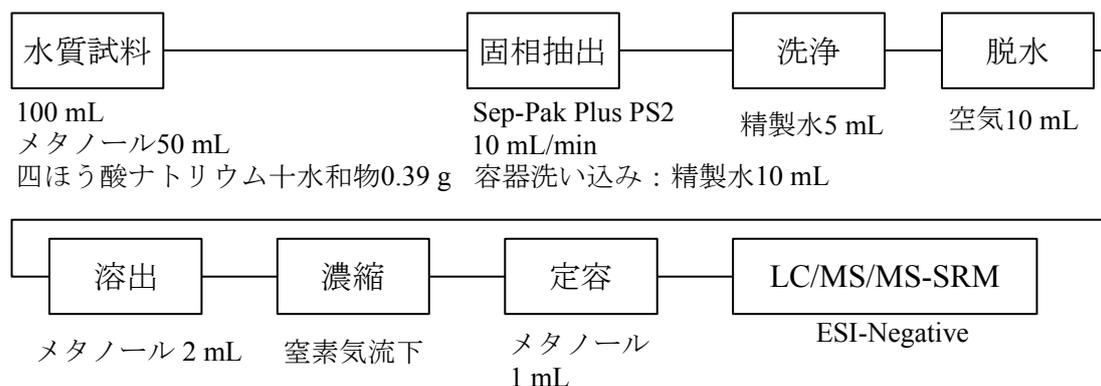
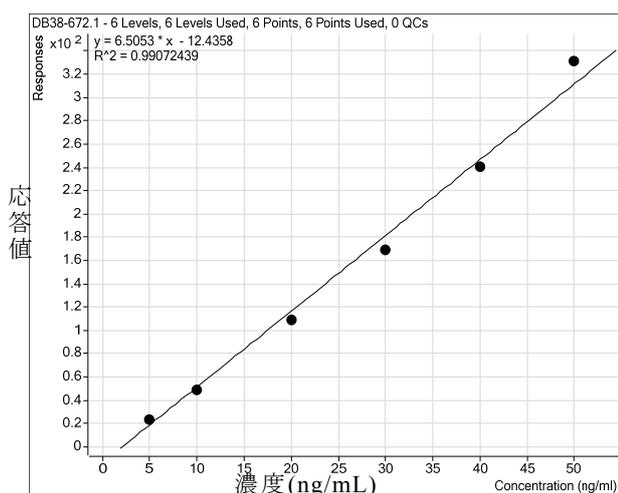


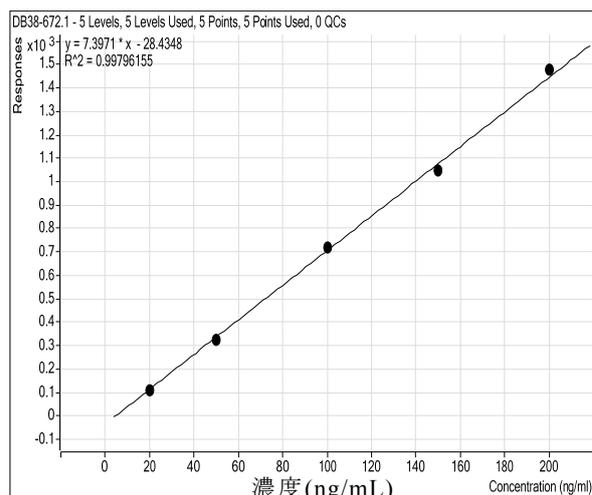
図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

図4にDB38の低濃度域（5～50 ng/mL）及び高濃度域（20～200 ng/mL）の検量線を示す。DB38については、5 ng/mL濃度を除いて検量線作成時の各濃度における確認イオンと定量イオンのピーク面積比率はほぼ一定であった（表5）。



低濃度域 (5.00～50.0 ng/mL)



高濃度域 (20.0～200 ng/mL)

図4 DB38(m/z 736.2>672.1)の検量線 (濃度範囲 5.00～200 ng/mL)

表 5 DB38 の検量線作成用データ

標準液 濃度 (ng/mL)	DB38 ピーク面積 プロダクトイオン			面積比	
	定量イオン(A)	確認イオン(B)	確認イオン(C)	B/A	C/A
	(m/z 672.1)	(m/z 643.8)	(m/z 631.3)		
5.00	23.61	9.94	2.49	0.42	0.11
10.0	49.71	16.16	14.91	0.33	0.30
20.0	109.36	34.80	32.31	0.32	0.30
30.0	169.70	63.38	59.65	0.35	0.37
40.0	238.15	84.51	81.47	0.35	0.34
50.0	331.83	113.09	113.09	0.34	0.34
100	714.73	236.75	256.56	0.33	0.36
150	1046.40	347.87	388.16	0.33	0.37
200	1478.03	456.95	508.78	0.31	0.34

* : プレカーサーイオン m/z 736.2

F260 は検量線作成時 2 本のピークが検出され、この面積の合算とメインピークの面積比は一定であった。F260 の定量には、2 本合算の面積を用いる (表 6)。F260 の検量線 (ピーク 2 本合算) を図 5 に、参考として F260 メインピークのみを検量線を図 6 に示す。

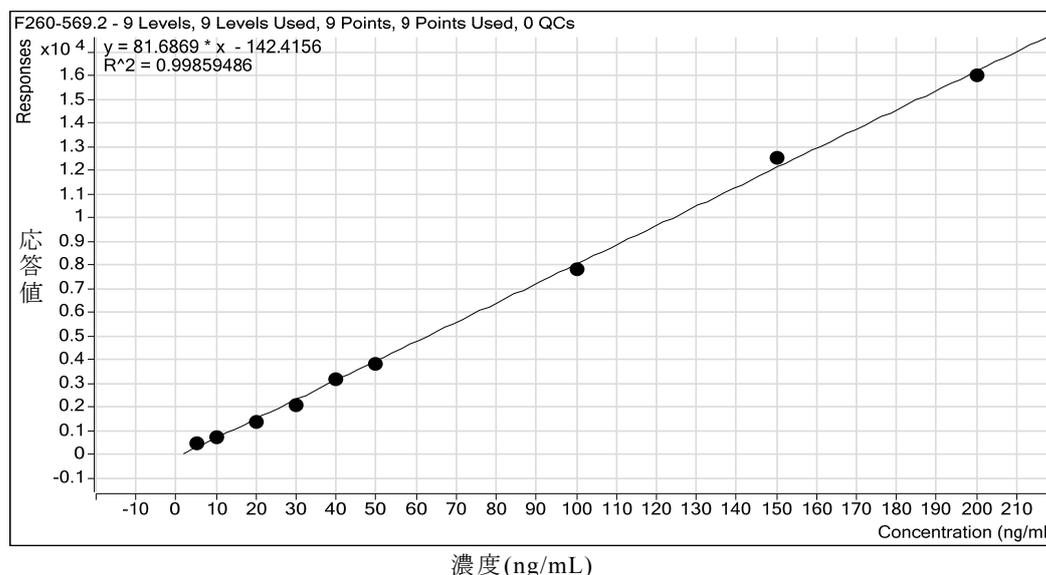


図 5 F260 (m/z 879.2>569.2) の検量線 (2 本合算)
(対象物質濃度範囲 5.00~200 ng/mL)

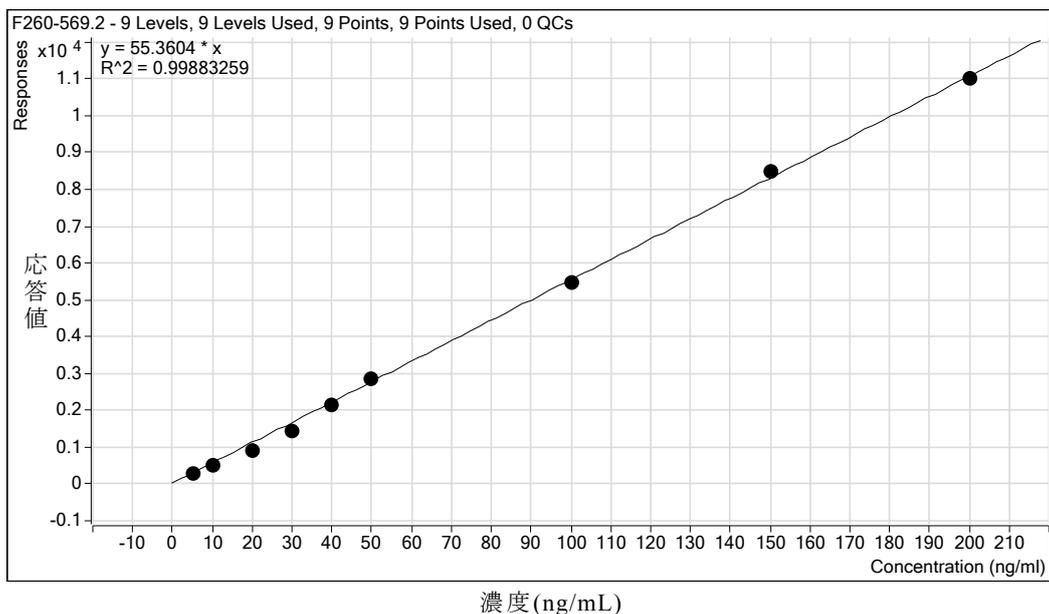


図 6 F260 ($m/z879.2>569.2$)メインピークでの検量線
 (対象物質濃度範囲 5.00~200 ng/mL)

表 6 F260 の検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	F260		
	ピーク面積 ($m/z879.2>569.2$)		面積比 B/A
	2 ピーク合算	メインピーク	
	(A)	(B)	
5.00	442.4	284.0	0.64
10.0	708.4	502.1	0.71
20.0	1396	1019	0.73
30.0	2063	1431	0.69
40.0	3172	2158	0.68
50.0	3819	2714	0.71
100	7819	5472	0.70
150	12538	8472	0.68
200	16040	11027	0.69

AV49 の検量線を図 7 に示す。

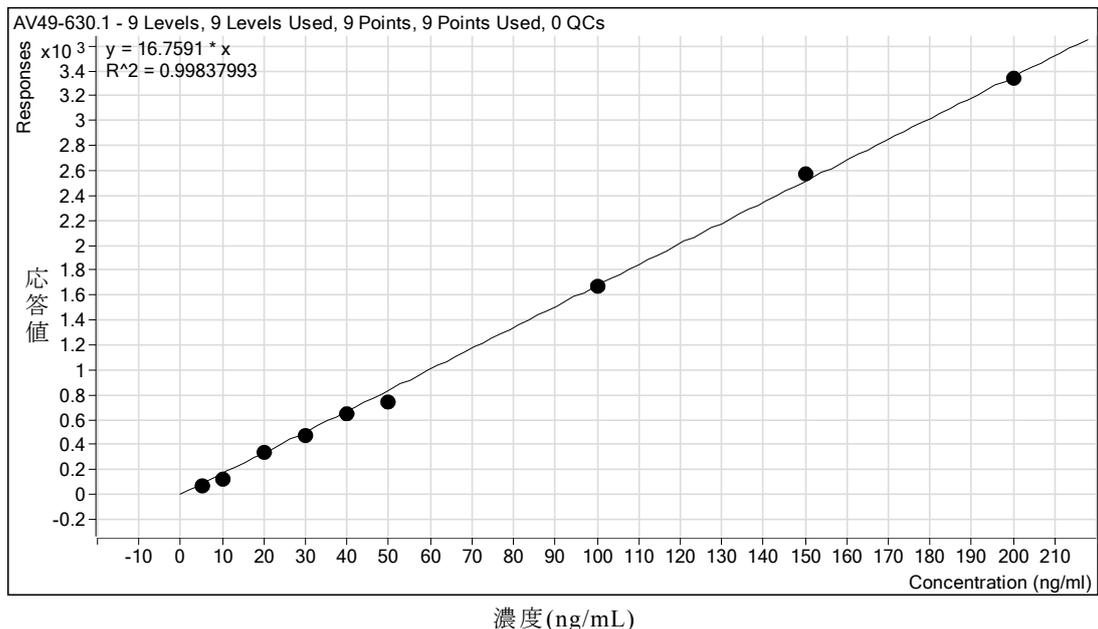


図 7 AV49 (m/z 710.2>630.1)の検量線
 (対象物質濃度範囲 5.00~200 ng/mL)

AV49 についても、検量線作成時の各濃度における確認のためのイオンと定量イオンのピーク面積比はほぼ一定であった (表 7)。

表 7 AV49 の検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL)	AV49		面積比 B/A
	ピーク面積		
	プロダクトイオン 定量イオン(A) (m/z 630.1)	確認イオン(B) (m/z 540.4)	
5.00	67.1	64.6	0.96
10.0	129.3	113.1	0.87
20.0	343.0	261.0	0.76
30.0	474.1	391.5	0.83
40.0	648.7	544.3	0.84
50.0	787.4	659.3	0.84
100	1668.9	1304.6	0.78
150	2578.7	2068.6	0.80
200	3342.0	2704.3	0.81

* : プレカーサーイオン m/z 710.2

[標準液のクロマトグラム]

標準液(100 ng/mL)のクロマトグラムを図 8 に示す。

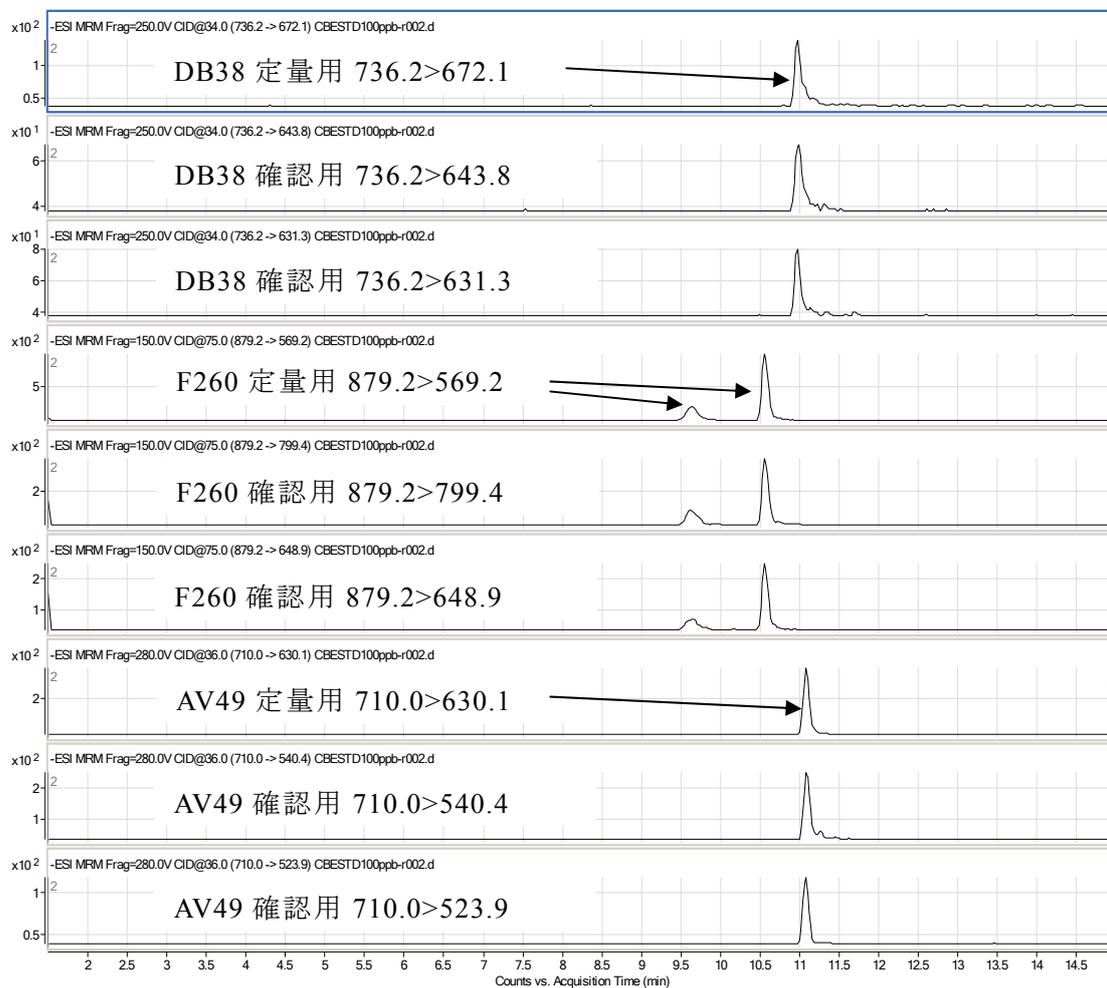


図 8 標準液(100 ng/mL)のクロマトグラム

[マススペクトル]

DB38 のマススペクトルを図 9~10 に示す。

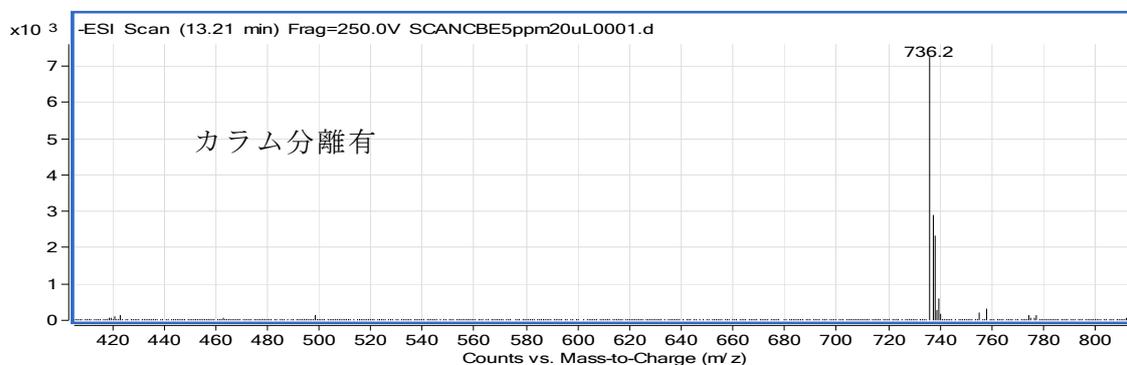
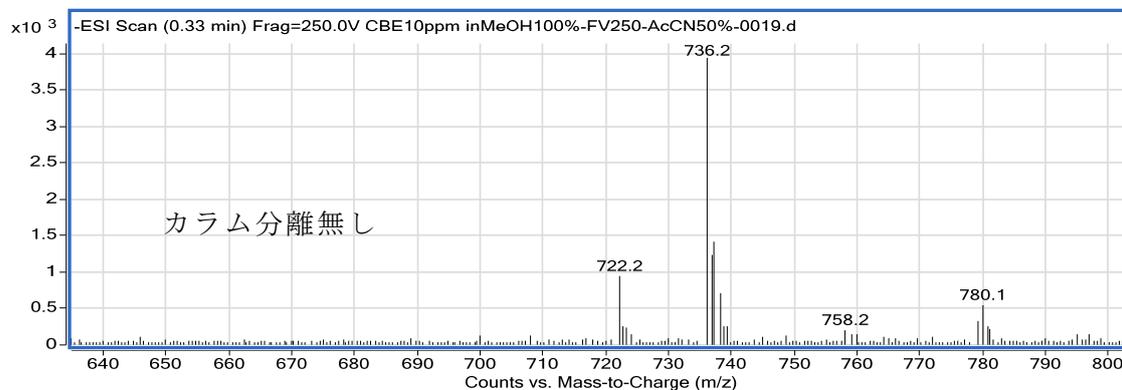


図 9 DB38 のプレカーサーイオンマススペクトル

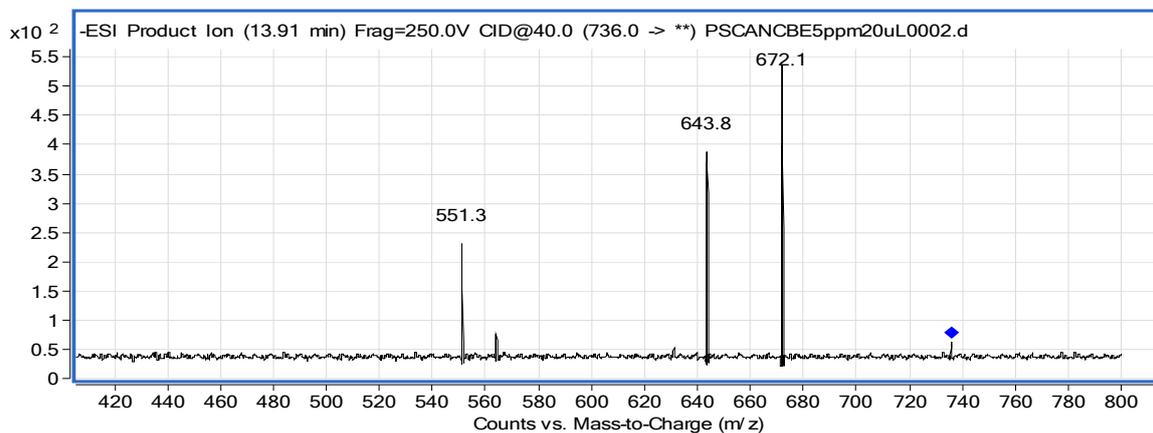


図 10 DB38 のプロダクトイオンマススペクトル
(プレカーサーイオン : m/z 736.2)

F260 のマススペクトル（カラム分離有）を図 11～12 に示す。

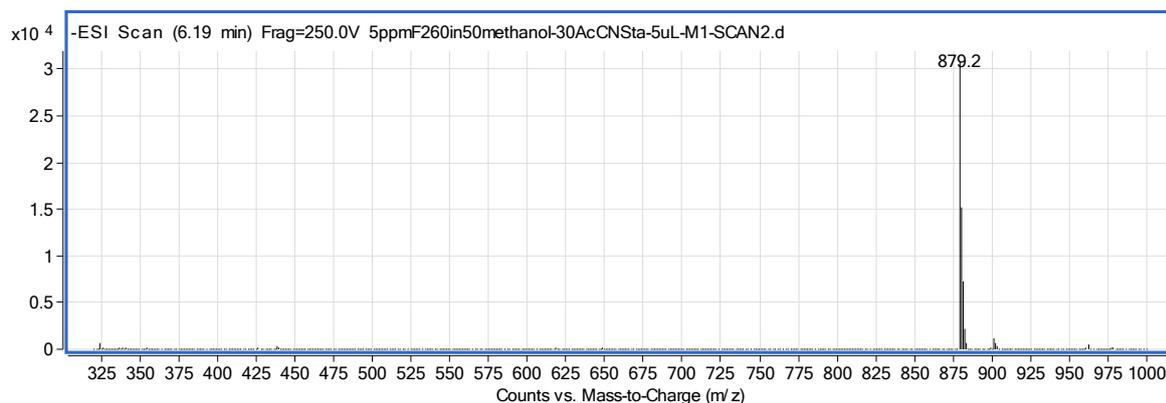


図 11 F260 のプレカーサーイオンマススペクトル

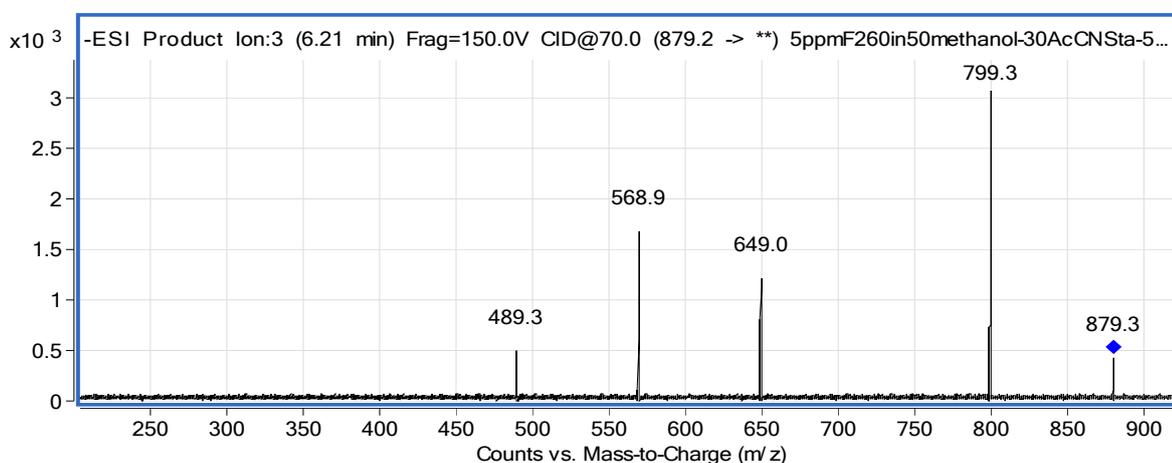


図 12 F260 のプロダクトイオンマススペクトル
(プレカーサーイオン : m/z 879.2)

次に AV49 のマススペクトル（カラム分離有）を図 13～14 に示す。

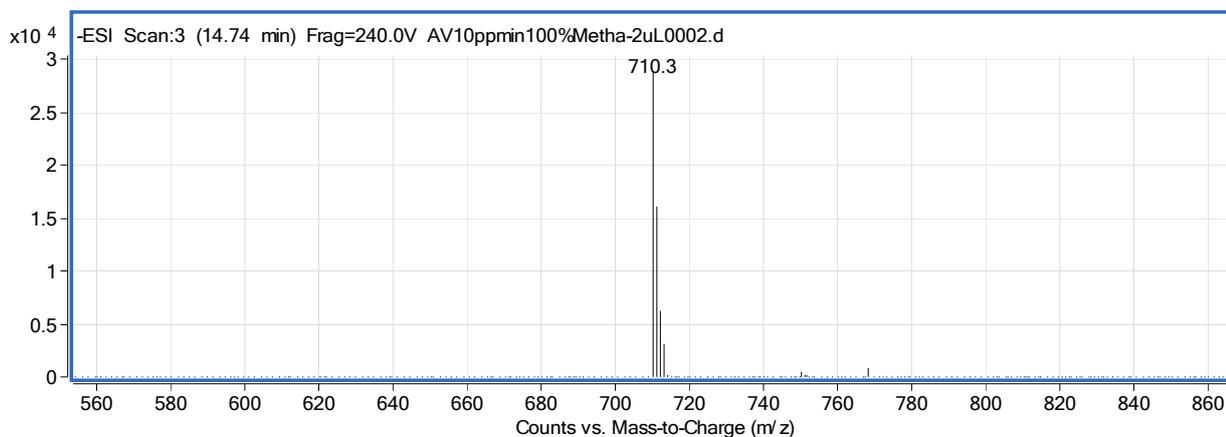


図 13 AV49 のプレカーサーイオンマススペクトル

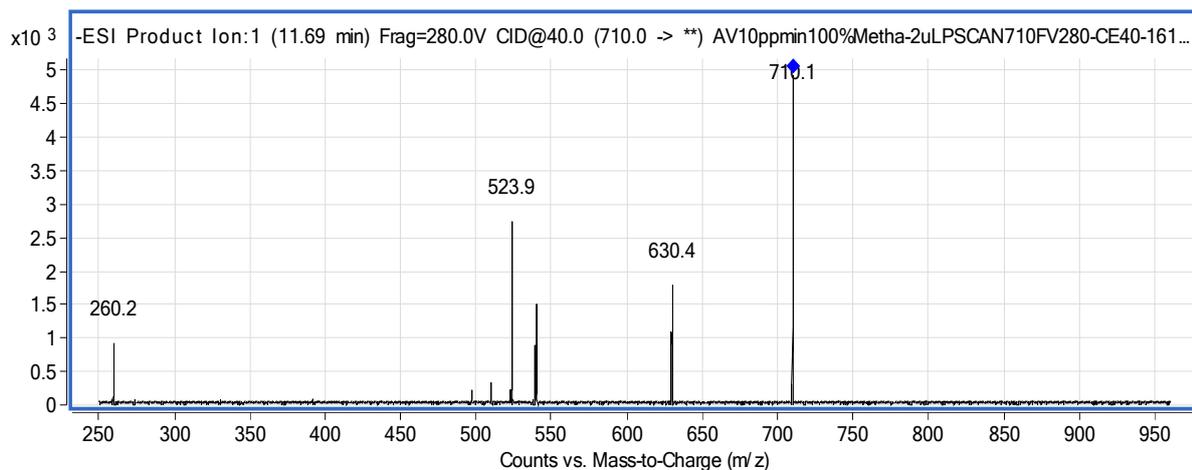


図 14 AV49 のプロダクトイオンマススペクトル
(プレカーサーイオン : m/z 710.2)

〔操作ブランク〕

操作ブランクのクロマトグラムを図 15 に示す。分析対象物質は、3 物質ともに操作ブランクは検出されなかった。

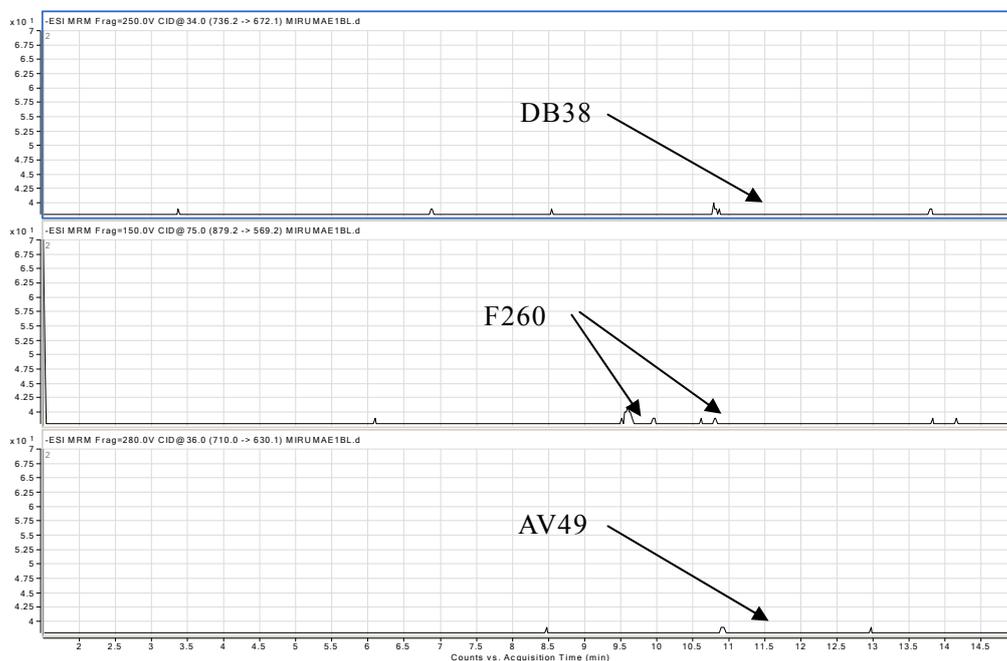


図 15 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

海水（三陸海岸大槌湾）及び河川水（盛岡市郊外見前川）への標準物質添加回収試験結果を表 8～10 に、河川水のクロマトグラムを図 16 に示す（海水の添加クロマトグラムは、図 2 MDL 測定時と共通）。

表 8 添加回収試験結果(DB38)

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
海水	100	無添加	3	ND	-	-
	100	20	7	205	102	3.4
	100	100	5	928	92.8	12.8
河川水	100	無添加	2	ND	-	-
	100	100	5	97.7	97.7	2.8

表 9 添加回収試験結果(F260)

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
海水	100	無添加	3	ND	-	-
	100	5	7	48.1	96.2	7.4
	100	50	5	416	83.2	8.3
河川水	100	無添加	3	325	-	4.4
	100	50	5	728	88.2	2.1

表 10 添加回収試験結果(AV49)

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
海水	100	無添加	3	ND	-	-
	100	7	7	65.6	93.8	8.2
	100	50	5	404	80.8	5.1
河川水	100	無添加	3	ND	-	-
	100	50	5	452	90.4	8.6

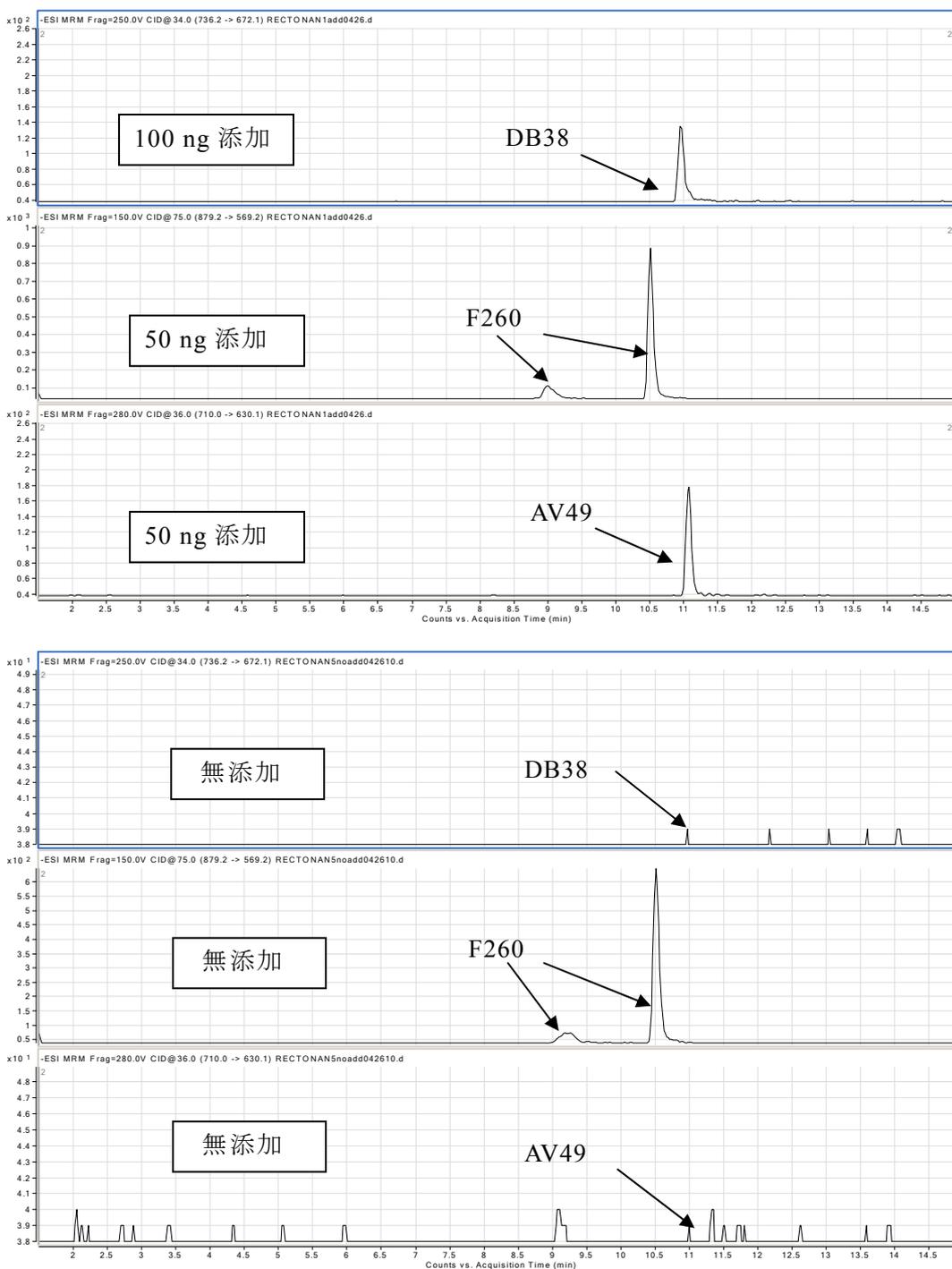


図 16 添加回収試験試料のクロマトグラム (河川水)

上 3 段 : 見前川河川水 100 mL に DB38 を 100 ng、F260 及び AV49 を
 それぞれ 50 ng 添加したクロマトグラム
 下 3 段 : 無添加の見前川河川水クロマトグラム
 F260 が 0.33 $\mu\text{g/L}$ 検出されている。

〔分解性スクリーニング試験〕

DB38 の分解性スクリーニング試験結果については、5 日後の残存率が暗所でも 20%以下となった。F260 については、明所では若干劣化が認められたが、暗所では分解性は認められなかった。AV49 については、暗所・明所ともに分解性は認められなかった（表 11）。

表 11 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	初期濃度 (ng/mL)	1 時間後の残存率 (%)	5 日後の残存率(%)	
				暗所	明所
DB38	5	50	70	0	-
	7	50	90	10	0
	9	50	100	20	-
F260	5	50	100	100	-
	7	50	100	98	70
	9	50	100	100	-
AV49	5	50	100	97	-
	7	50	100	102	95
	9	50	100	98	-

〔保存性試験〕

環境水、試験液及び標準液における保存性試験結果を表 12 に示す。

本試験を実施するにあたって、D38 の濃度減衰を防ぐため、試料量に対してメタノール 50% 添加して冷暗所に一定時間保管した。また、DB38 は、分解性スクリーニング試験結果から酸性の試料中ではさらに消失しやすいことから、メタノールに加えて四ほう酸ナトリウム十水和物も各試料に対して 0.39 g 添加した（添加後 pH9）。なお、試験液は、100 mL の環境水に DB38 を 100 ng、F260 及び AV49 を各 50 ng 添加し、本分析法により 1 mL に濃縮したものを試験に供した。

表 12 保存性試験結果

試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)				
		1 日間	7 日間	14 日間	1 ヶ月	
環境水	河川水	0.05	97	94	-	-
	海水	0.05	98	105	-	-
DB38 試験液	河川水	100	100	98	-	94
	海水	100	-	-	-	98
検量線 標準液	低濃度	10	-	95	90	-
	最高濃度	200	-	-	-	98
環境水	河川水	0.05	100	95	-	-
	海水	0.05	100	98	-	-
F260 試験液	河川水	50	-	98	-	101
	海水	50	-	-	-	99
検量線 標準液	低濃度	10	-	94	92	-
	最高濃度	200	-	-	-	99
環境水	河川水	0.05	-	96	-	-
	海水	0.05	-	100	-	-
AV49 試験液	河川水	50	-	98	-	93
	海水	50	-	-	-	101
検量線 標準液	低濃度	10	-	97	97	-
	最高濃度	200	-	-	-	101

〔DB38 の保存性改善の検討〕

- 1) 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール(BHT : C₁₅H₂₄O)、3(2) -*t*-ブチル-4-ヒドロキシルアニソール(BHA : C₁₁H₁₆O₂)、6-エトキシ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリン(EMQ : C₁₄H₁₉NO)及びアスコルビン酸をそれぞれメタノール 20 mL に 0.1 g 溶解し、100 mL の試料 (海水) に添加し効果を確認した。3 日間放置後の分析結果、BHT 及び EMQ については保存性が悪化し、アスコルビン酸及び BHA の添加でも DB38 の保存性を改善する効果は得られなかった。また、メタノール中に不純物として含まれと予想されるホルムアルデヒドを 1~数滴試料に添加したが保存性改善の効果は得られなかった。
- 2) メタノール添加による保存性の改善試験結果を図 17 に示す。分解性スクリーニング試験でアルカリ側の方が残存率は若干良好であったことから pH 9 に調整した海水を試験液として用いた。この試験液にメタノールを試料量に対して 10%から 50%添加してそれぞれ残存性を測定し

た。検討の結果、DB38 は、メタノール添加 40~50%で 5 日間保存が可能であった。

また、同時に検討した F260 及び AV49 については、メタノール無添加から 50%添加までのいずれの保存条件でも 90%以上残存しており保存性は良好であった。

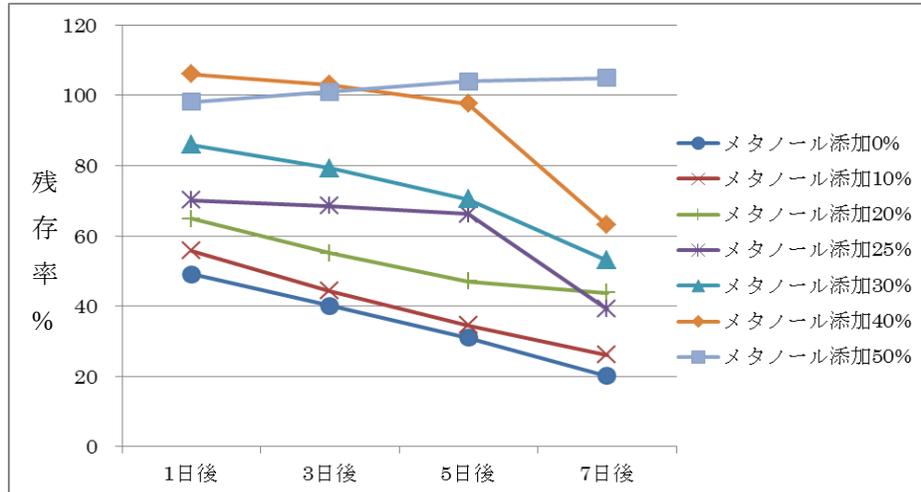


図 17 メタノール添加による DB38 保存性の改善効果

〔その他の検討結果〕

〔DB38 の分解生成物の検討〕

DB38 濃度 50 mg/L の水溶液を 1 か月放置後、SCAN モード（カラム分離条件は定量の条件に同じ）で分析した結果、保持時間 10.7 分の DB38 (m/z 736.2)のピークより大きなピークが 9.95 分(m/z 602.2)及び 11.9 分(m/z 722.3)に出現した。また、これら 2 つのピークより小さいが 15.8 分にも m/z 706.2 のピークが出現した。これらの物質の生成により DB38 の残存率が減少しているものと推定された。

〔固相抽出検討結果〕

1) 固相カートリッジの検討

対象とした 3 物質の回収率は、C8 では 39~81%の範囲であったが、C18、PS2 及び HLB ではいずれも 70%以上の良好な回収率が得られた（表 13）。本分析法においては、環境水中の化学物質分析に多く使用されておりメタノールを添加しても回収率の良好であった PS2 を選択した。

表 13 固相カートリッジ選択検討結果(n=3)

固相 カートリッジ	回収率(%)*		
	DB38	F260	AV49
C8	39.9	104	98.3
C18	72.6	98.1	96.0
PS2	79.6	100	97.0
HLB	80.7	96.6	97.6

*各物質 10 µg/L の標準液を 10 mL 添加して回収試験実施

2) 固相からの溶出条件の検討

メタノールによる分析対象物質の固相からの溶出を検討した結果を次の表に示す(表 14)。メタノール 2 mL で 3 物質ともに 99%以上溶出された(目的物質の固相への吸着は表 13 と同じ)。

表 14 固相 PS2 からのメタノールによる溶出検討

溶出メタノール	回収率(%)		
	DB38	F260	AV49
0~1 mL	99.4	99.7	98.8
1~2 mL	0.6	0.3	1.2
2~3 mL	<0.1	<0.1	<0.1
3~4 mL	<0.1	<0.1	<0.1

〔検量線標準液組成及び容器検討結果〕

標準液 50 ng/mL の溶液を、メタノール 50、60、70、90 の水溶液、メタノール 100%で感度の比較を試みた。溶液の組成による感度の変化はなかった。

また、保存容器としてガラスバイヤル、プラスチックバイヤルを採用して、標準液を冷暗所に 2 週間放置したが容器の種類に起因する変化はなかった。

〔環境試料の分析〕

本法を用いて、盛岡市内の下水処理場(標準活性汚泥法)放流水の影響の強い河川水(盛岡市郊外見前川)及び東日本大震災津波被災地の海水(三陸海岸大槌湾)を測定した結果、DB38、AV49 は、いずれも MDL 未満であった。F260 については、見前川河川水から 0.33 µg/L 検出された(図 16)。

【評価】

本法における環境水質試料中のジナトリウム=4-アミノ-3-[4'-(2,4-ジアミノフェニルアゾ)-1,1'-ビフェニル-4-イルアゾ]-5-ヒドロキシ-6-フェニルアゾ-2,7-ナフタレンジスルホナート(DB38)のIDLは、1.9 ng/mL (試料換算濃度 0.019 µg/L)であり、検量線は 5.00~200 ng/mL の範囲で直線性 ($r^2 > 0.99$) が確認された。本分析法のMDL及びMQLは、0.027及び0.070 µg/Lであり操作ブランクは検出されなかった。海水 100 mL に対象物質を 0.100 µg 添加した時の回収率は、92.8%、変動係数は 12.8%であった。この結果から、本法は、環境水質試料中に含まれる DB38 の 0.1 µg/L オーダーの定量分析に適用が可能であると判断できる。また、DB38 は環境水質試料からは検出されなかった。

なお本法は、関連するジナトリウム=2,2'-ビニレンビス[5-(4-ホルホルノ-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](F260)及びナトリウム=3-(*N*-{4-[4-{ジメチルアミノ}フェニル}(4-{*N*-エチル[(3-スルホナトフェニル)メチル]アミノ}フェニル)メチレン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン}-*N*-エチルアンモニオ)ベンゼンスルホナート(AV49)を含めた同時分析が可能である。それぞれの定量下限は、F260が 0.036 µg/L、AV49が 0.060 µg/L であり操作ブランクは両物質ともに検出されなかった。

【担当者連絡先】

所属先名称：岩手県環境保健研究センター

所属先住所：〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡一丁目 11 番 16 号

TEL：019-656-5670 FAX:019-656-5671

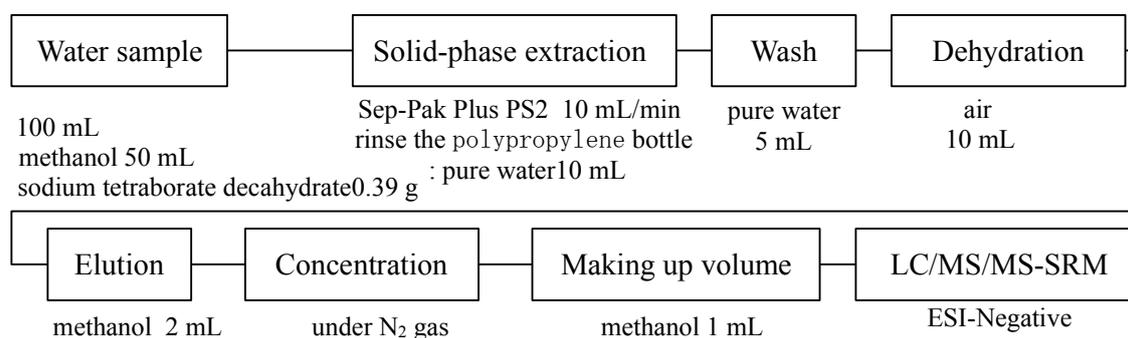
担当者名：佐々木和明

E-mail：s-kazuaki@pref.iwate.jp

Disodium 4-amino-3-[[4'-[(2,4-diaminophenyl)azo][1,1'-biphenyl]-4-yl]azo]-5-hydroxy-6-(phenylazo)naphthalene-2,7-disulphonate (DB38), 2'-(1,2-ethenediyl)bis[5-[[4-(4-morpholinyl)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-Benzenesulfonic acid], disodium salt (F260), [4-[[4-(dimethylamino)phenyl][4-[ethyl(3-sulphonatobenzyl)amino]phenyl]methylene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene](Ethyl) (3-sulphonatobenzyl)ammonium,sodium salt (AV49)

This method provides procedures for determination of DB38, F260 and AV49 in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Water sampling is performed using the polypropylene bottle that 50 mL of methanol and 0.39 g of sodium tetraborate decahydrate are added in beforehand. The sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Sep-Pak Plus PS2) at a flow rate of 10 mL/min. Then, the cartridge is washed with 5 mL of pure water. The adsorbed analytes in the cartridge are eluted with 2 mL of methanol. The eluate is concentrated under nitrogen flow, and adjusted to 1 mL with methanol. The sample solution is analyzed by LC/MS/MS-SRM (ESI negative).

The method detection limits (MDL) of DB38, F260 and AV49 are 0.027, 0.014 and 0.023 µg/L, respectively. The averages of recoveries of water samples ranged from 93 to 102% (relative standard deviation: 2.8 - 13%) for DB38, from 83 to 96% (relative standard deviation: 2.1– 8.3%) for F260 and from 81 to 94% (relative standard deviation: 5.1 – 8.6%) for AV49, respectively. Using this method, the concentration of F260 detected from river water was 0.33 µg/L.



物質名	分析法フローチャート	備考
<p>[1] ジナトリウム =4-アミノ -3-[4'-(2,4-ジアミ ノフェニルア ゾ)-1,1'-ビフェニ ル-4-イルアゾ]-5- ヒドロキシ-6-フェ ニルアゾ-2,7-ナフ タレンジスルホナ ート (別名:ダイレ クトブラック 38)</p> <p>[2] ジナトリウム =2,2'-ビニレンビス [5-(4-ホルホリノ -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)</p> <p>[3] ナトリウム =3-(N-{4-[4-{ジメ チルアミノ}フェニ ル}(4-{N-エチル [(3-スルホナトフ ェニル)メチル]ア ミノ}フェニル)メ チレン]-2,5-シクロ ヘキサジエン-1-イ リデン}-N-エチル アンモニオ)ベンゼ ンスルホナート (別 名:アシッドバイオ レット-49)</p>	<p>【水質】</p> <p>水質試料</p> <p>100 mL メタノール 50 mL 四ほう酸ナトリウム十水和物 0.39 g</p> <p>固相抽出</p> <p>Sep-Pak Plus PS2 10 mL/min 容器洗い込み: 精製水 10 mL</p> <p>洗浄</p> <p>精製水 5 mL</p> <p>脱水</p> <p>空気 10 mL</p> <p>溶出</p> <p>メタノール 2 mL</p> <p>濃縮</p> <p>窒素気流下</p> <p>定容</p> <p>メタノール 1 mL</p> <p>LC/MS/MS-SRM</p> <p>ESI-Negative</p>	<p>分析原理: LC/MS/MS-SRM (ESI-Negative)</p> <p>検出下限値: 【水質】(ng/L)</p> <p>[1] 27 [2] 14 [3] 23</p> <p>分析条件: 機器 LC: 1200 (Agilent) MS: 6410 (Agilent) カラム: Eclips Plus C-18 (2.1×100 mm, 1.8 μm)</p>