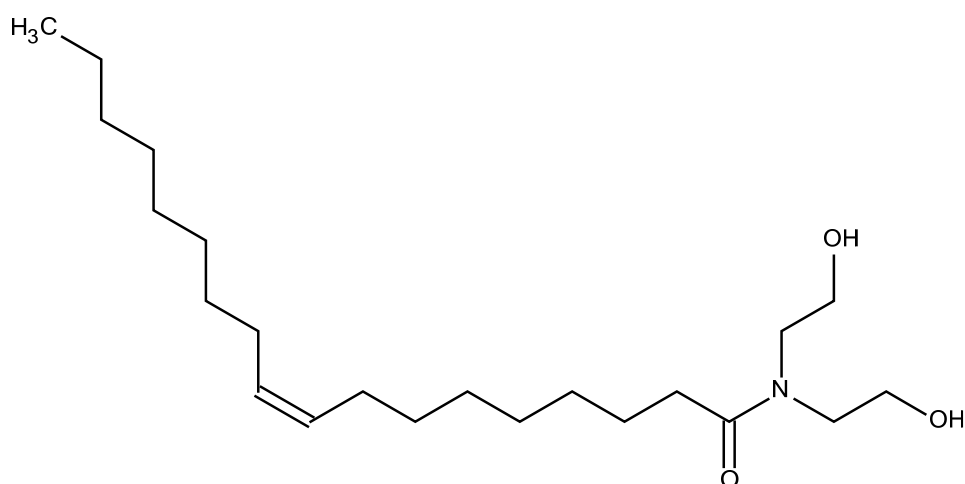


(Z)-N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド

(Z)-N,N-Bis(2-hydroxyethyl)oleamide

別名：N,N-ジエタノールオレイン酸アミド

【対象物質の構造】



CAS 番号：93-83-4

分子式：C₂₂H₄₃NO₃

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モノイットピック質量)	水溶解度 ^{*1} (mg/L)	log P _{ow} ^{*1}
N,N-ジエタノール オレイン酸アミド	369.58 (369.3243)	0.0753 (推定値)	5.62 (推定値)

【毒性、用途】

〔毒性〕

急性毒性^{*2} ラット経口 LD₅₀：12.4 (mL/kg)、マウス経口 LD₅₀>10 (mg/kg)

〔用途〕

医薬部外品添加物（シャンプー起泡剤、増粘剤）^{*3}

出典

- 1) SRC PhysProp Database
- 2) 製品安全データシート、和光純薬
- 3) (独) 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)

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料をジクロロメタン抽出し、アセトニトリルで定容後、LC/MS/MS- SRM (ESI+)法で定量を行う。

(2) 試薬・器具

【試薬】

<i>N,N</i> -ジエタノールオレイン酸アミド	: 和光純薬工業製
1mol/L 酢酸アンモニウム溶液	: 和光純薬工業製 高速液体クロマト グラフ用
アセトニトリル、メタノール	: 和光純薬工業製 LC/MS 用
精製水	: 和光純薬工業製 LC/MS 用
ジクロロメタン	: 関東化学製 Primepure(M) (注 1)
<i>L</i> (+)-アスコルビン酸	: 和光純薬工業製 特級

【標準液の調製】

〔標準液〕

N,N-ジエタノールオレイン酸アミド 10.0 mg を正確に量り取り、メタノール 10 mL に溶解して 1000 µg/mL の標準原液を調製する。

〔検量線用標準液〕

標準原液をアセトニトリルで順次希釈し、0.100 ng/mL から 10.0 ng/mL の範囲の検量線用標準液を調製する。

【器具】

300 mL 分液ロート、10 mL 共栓付遠心管

(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 28 年 3 月）における「試料の採取及び検体の調製等」に従う。試料はガラス容器に採取後、速やかに試験操作を行う。速やかに行えない場合は、水質試料は 1 L につき L(+)-アスコルビン酸を 1 g 加え、冷暗所に保存する（注 2）。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 100 mL を 300 mL 分液ロートに取り、ジクロロメタン 10 mL を加え、10 分間振とう抽出後、ジクロロメタン層を 10 mL 共栓付遠心管に移す。アセトニトリル 1 mL を加え、窒素気流下で 0.5 mL まで濃縮する。アセトニトリルで 2.0 mL に定容し、試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同量の精製水を用い、【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 条件〕

LC 条件

使用機種 : 島津製 Nexera X2

カラム : Waters 製 XBridge C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)

移動相 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール(15:85) アイソクラテック

流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 2 μL

MS 条件

使用機種 : 島津製 LCMS-8050

イオン化法 : ESI-Positive

測定モード : SRM

インターフェース電圧 : 1.0 kV

ヒーティングガス流量 : 10 L/min

ドライイングガス流量 : 10 L/min

ネブライザーガス流 : 2 L/min

インターフェース温度 : 300°C

DL 温度 : 250°C

ヒートブロック温度 : 400°C

物質名	モニターイオン (<i>m/z</i>)	コリジョン電圧(CE) (V)
<i>N,N</i> -ジエタノール	370.3>106.2 (定量用)	15
オレイン酸アミド	370.3> 88.1 (確認用)	30

〔検量線〕

検量線用標準液 2 μL を LC/MS に注入し、対象物質の濃度及びピーク面積から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 2 μL を LC/MS に注入し、対象物質のピーク面積から検量線により *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドの濃度を定量する。

〔濃度の算出〕

試料中濃度 *C* (ng/ L)は次式により算出する。

$$C(\mu\text{g/L}) = \text{検出濃度}(\text{ng/mL}) \times \text{最終液量}(\text{mL}) / \text{試料水量} (\text{mL})$$

本分析法に従った場合、

$$C(\mu\text{g/L}) = \text{検出濃度}(\text{ng/mL}) / 50$$

である。

〔装置検出下限値 (IDL)〕

本分析法に用いた LC/MS の IDL を表 1 に示す (注 3)。

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 (μg/L)
<i>N,N</i> -ジエタノール オレイン酸アミド	0.016	100	2.00	0.00032

〔測定方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値 (MQL)〕

本分析法における MDL 及び MQL を表 2 に示す（注 4）。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
<i>N,N</i> -ジエタノール オレイン酸アミド	水質	100	2.00	0.0013	0.0033

注 解

- （注 1）ブランクが検出されなかった関東化学製 Primepure(M)グレードとした。
後述、〔操作ブランクの検討〕の項を参照のこと。
- （注 2）酸化防止剤の *L*(+)-アスコルビン酸を添加することで、保存性が向上する。
後述、〔保存性試験〕の項を参照のこと。
- （注 3）IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 28 年 3 月）に従って、表 3 のとおり算出した。測定時の代表的なクロマトグラムを図 1 に示す。

表3 IDL の算出結果

物質名	<i>N,N</i> -ジエタノールオレ イン酸アミド
試料量(mL)	100
最終液量(mL)	2.00
注入液濃度(ng/mL)	0.100
装置注入量(μL)	2.0
結果 1(ng/mL)	0.0880
結果 2(ng/mL)	0.0911
結果 3(ng/mL)	0.0898
結果 4(ng/mL)	0.0905
結果 5(ng/mL)	0.0995
結果 6(ng/mL)	0.0914
結果 7(ng/mL)	0.0862
平均値(ng/mL)	0.09093
標準偏差(ng/mL)	0.00407
IDL(ng/mL)	0.016
IDL 試料濃度換算値(μg/L)	0.00032
S/N	23
CV%	4.5
IDL= $t(n-1,0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$	

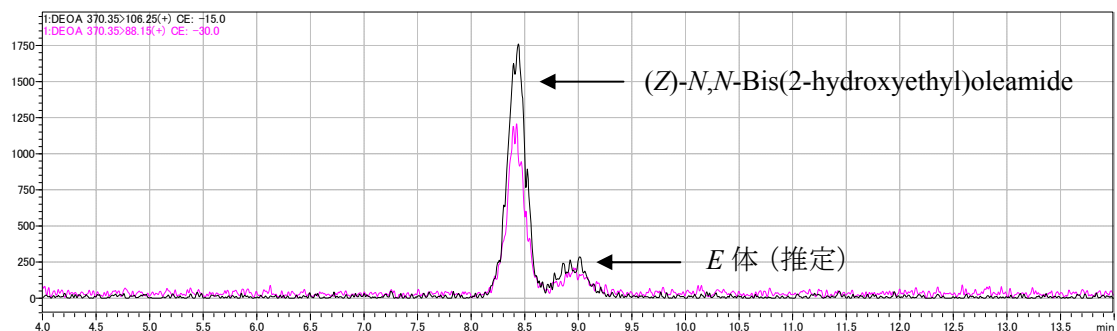


図1 IDL 測定時の代表的なクロマトグラム(0.100 ng/mL)

(注 4) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)により、表 4 のとおり算出した。測定時の代表的なクロマトグラムを図 2 に示す。

表 4 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	<i>N,N</i> -ジエタノールオレイン酸 アミド
試料	水質 (海水)
試料量 (mL)	100
標準添加量 (ng)	0.200
試料換算濃度 (µg/L)	0.00200
最終液量 (mL)	2.00
注入液濃度 (ng/mL)	0.100
装置注入量 (µL)	2.0
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1}	ND
無添加平均 (ng/L) ^{*2}	ND
結果 1 (ng/L)	2.88
結果 2 (ng/L)	2.25
結果 3 (ng/L)	2.34
結果 4 (ng/L)	2.02
結果 5 (ng/L)	2.27
結果 6 (ng/L)	1.87
結果 7 (ng/L)	1.99
平均値 (ng/L)	2.232
標準偏差 (ng/L)	0.332
MDL (µg/L) ^{*3}	0.0013
MQL (µg/L) ^{*4}	0.0033
S/N 比	37
CV (%)	15

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

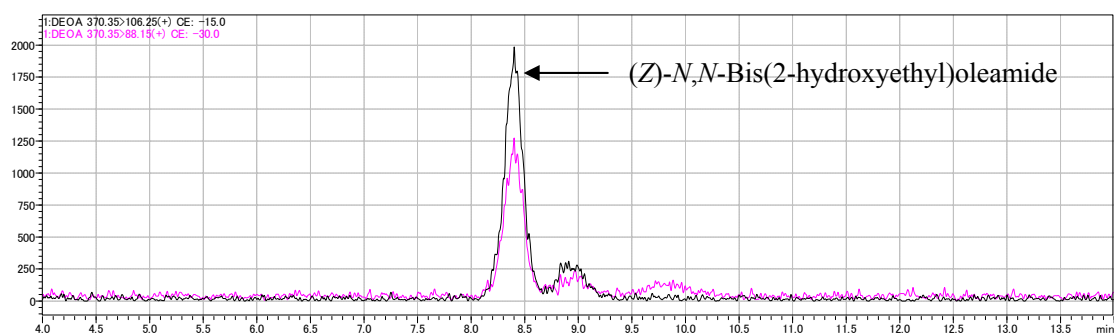


図2 MDL 測定時のクロマトグラム(0.100 ng/mL)

§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。

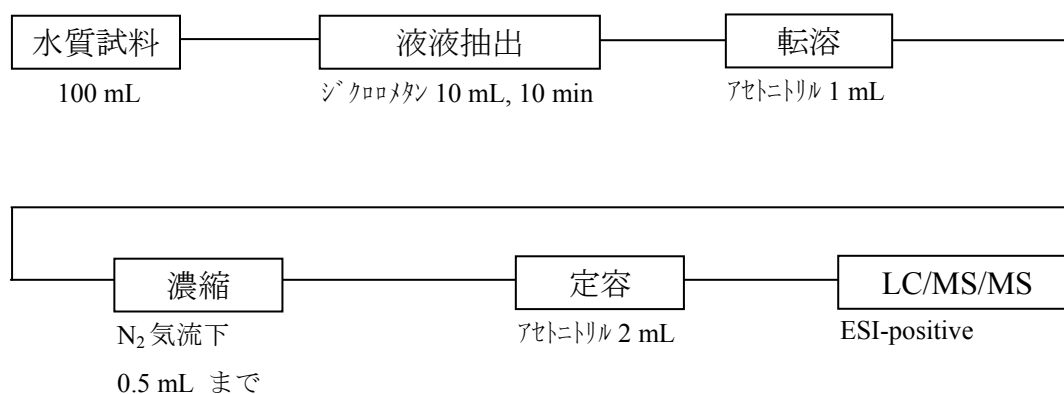


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図4に、検量線作成用データを表5に示す。検量線用標準液測定時のクロマトグラムを図5に示す。

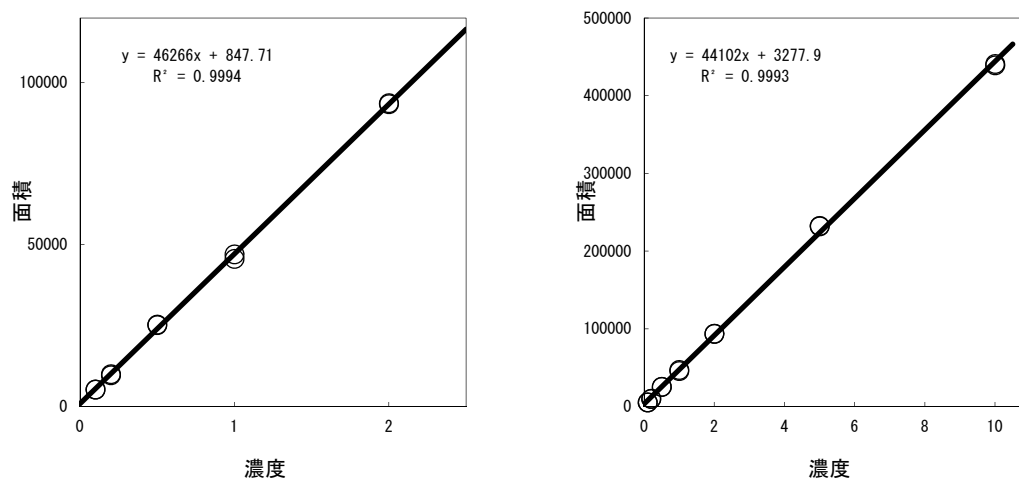


図4 N,N -ジエタノールオレイン酸アミド
(対象物質濃度範囲 0.100～2.00 ng/mL (左図)、0.100～10.0 ng/mL (右図))

表5 N,N -ジエタノールオレイン酸アミドの検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (C_s)	応答値 (A_s)
	N,N -ジエタノールオレイン酸 アミド(A_s)
0.100	5236
0.100	5202
0.200	9972
0.200	9637
0.500	25293
0.500	25129
1.00	45589
1.00	46985
2.00	93679
2.00	93377
5.00	231806
5.00	232372
10.0	439041
10.0	440804

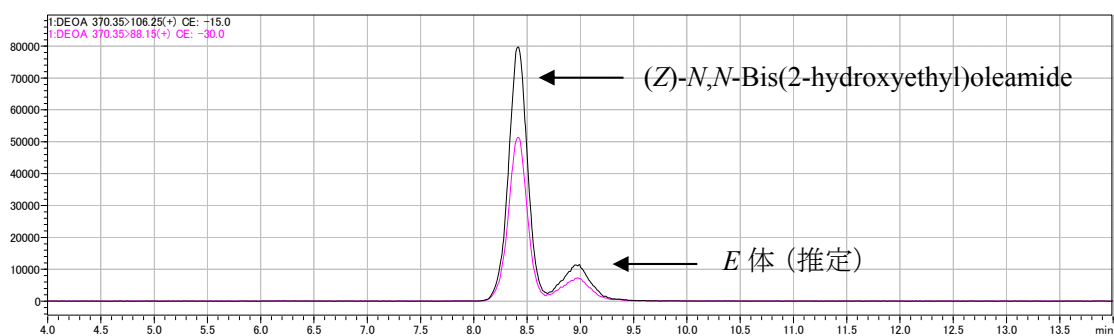


図5 標準液のクロマトグラム(5.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

N,N-ジエタノールオレイン酸アミドのマススペクトルを図6、7に示す。

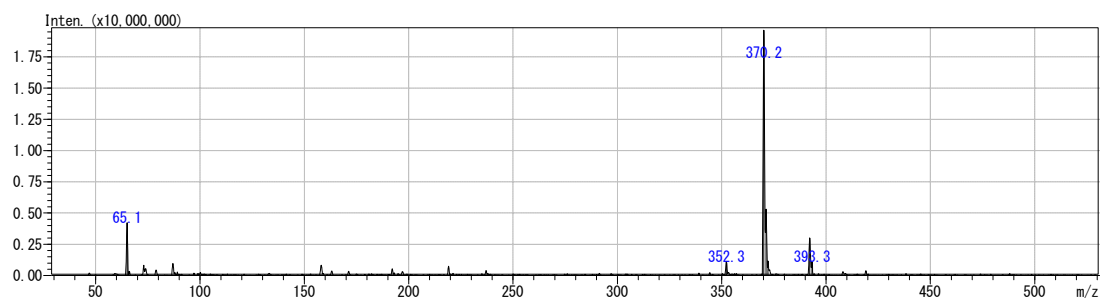


図6 *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドの
プレカーサーイオンマススペクトル

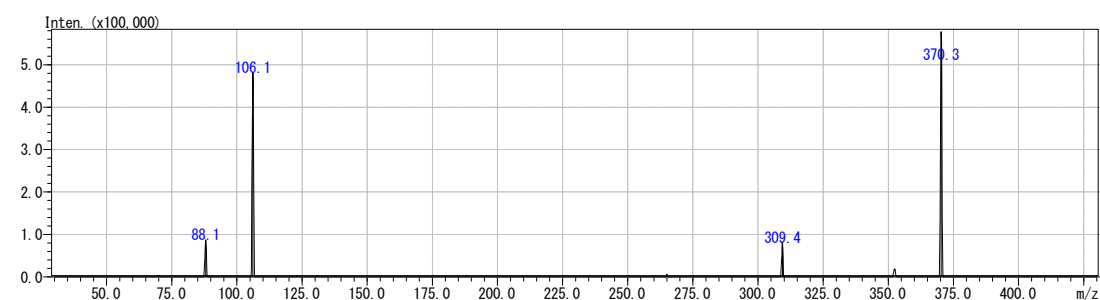


図7 *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドのプロダクトイオンマススペクトル
(プレカーサーイオン: m/z 370.35)

〔操作ブランク〕

精製水を用いて操作ブランクの検討を行った結果、対象物質は検出されず、妨害となるピーク等も観察されなかった。操作ブランク測定時のクロマトグラムを図8に示す。

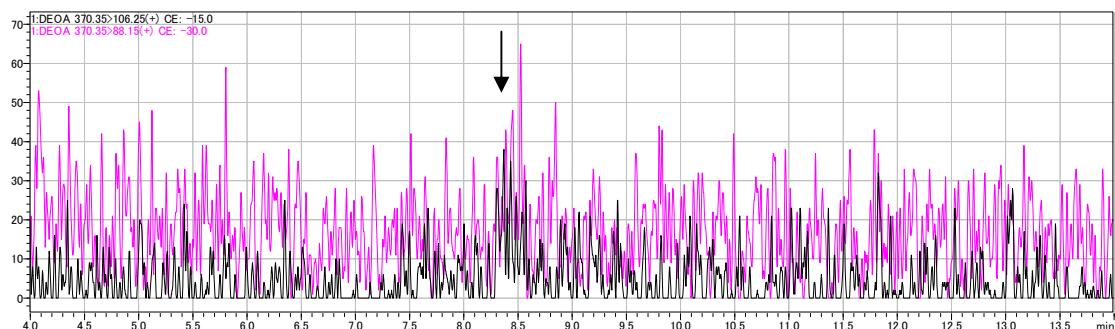


図 8 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

試料 100 mL に標準物質を添加して、ジクロロメタン 10 mL で振とう抽出を行った。検出された量を回収率 (%) として表す。添加回収試験時のクロマトグラムを図 9～12 に示す。

表 6 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	試験 数	添加量 (ng)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
N,N- ジエタノールオレイン酸アミド	海水	0.1	1	無添加	ND	-	-
	海水	0.1	7	0.2	2.23	112	14.9
	海水	0.1	2	1.0	10.6	106	-
	河川水	0.1	1	無添加	ND	-	-
	河川水	0.1	2	1.0	10.1	101	-
	河川水	0.1	5	2.0	19.7	98.4	7.2

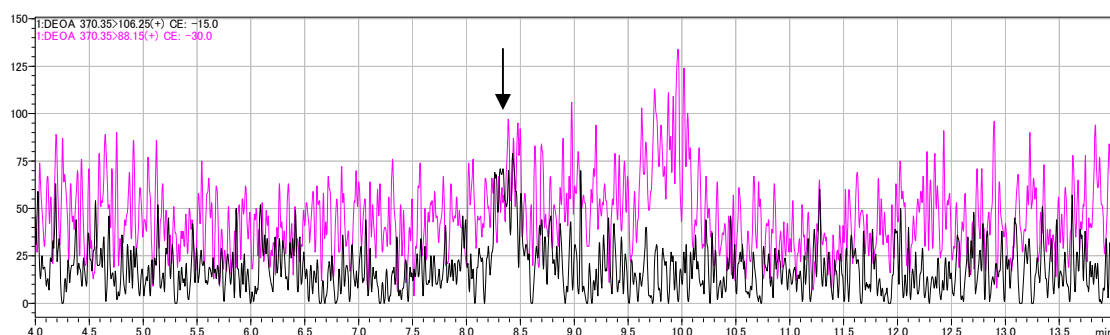


図 9 添加回収試験時のクロマトグラム（河川水、無添加試料）

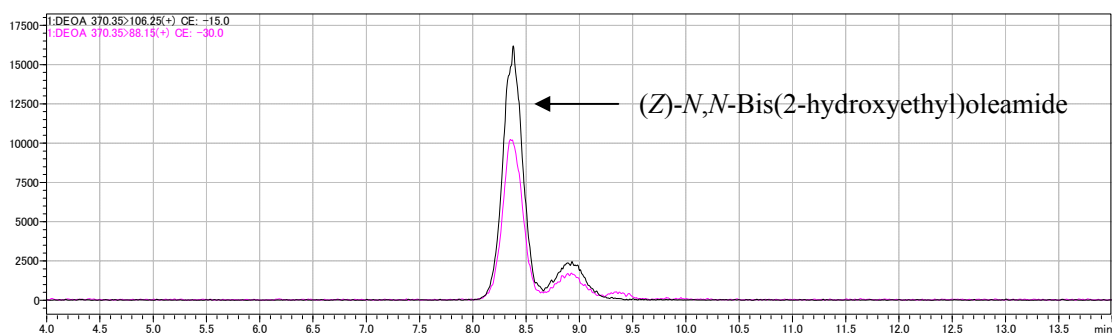


図 10 添加回収試験時のクロマトグラム（河川水、添加試料 1 ng/100 mL）

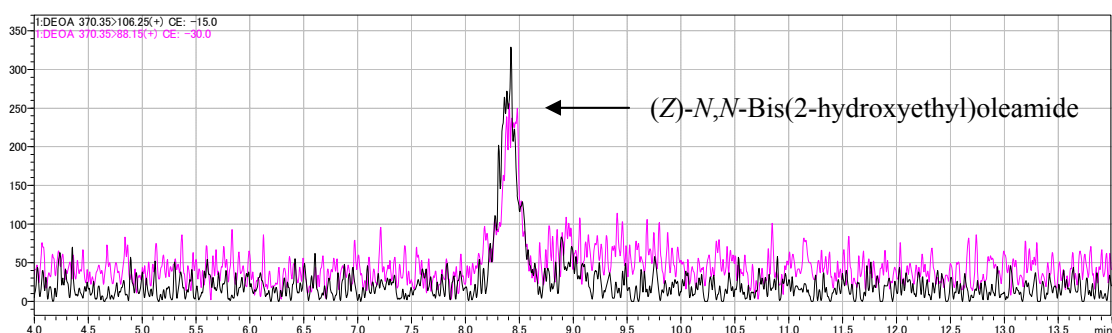


図 11 添加回収試験時のクロマトグラム（大牟田沖、無添加試料）

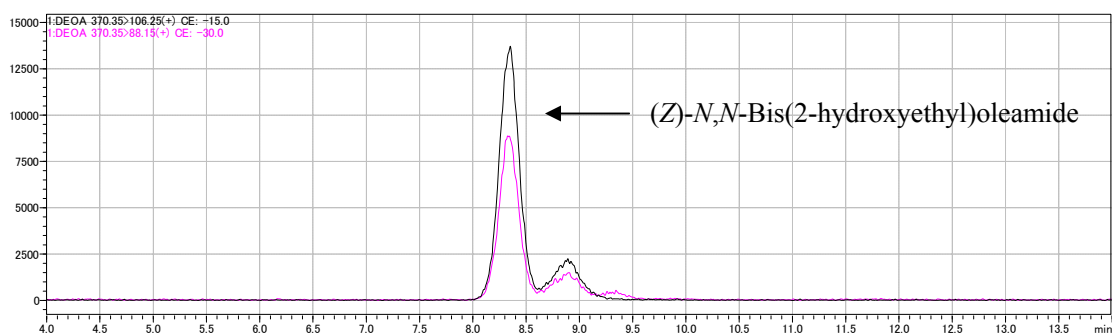


図 12 添加回収試験時のクロマトグラム（大牟田沖、添加試料 1 ng/100 mL）

〔分解性スクリーニング試験結果〕

表 7 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	1 時間後 の残存率 (%)	7 日後の残存率(%)	
				暗所	明所
<i>N,N</i> -ジエタノール オレイン酸アミド	5	0.01	100	43.8	-
	7	0.01	100	47.3	39.4
	9	0.01	100	43.2	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔保存性試験〕

表 8 保存性試験結果

試料	調製濃度 (ng/mL)	残存率(%)*			
		3 日間	6 日間	14 日間	1 か月
環境水	0.02	59.9	33.8	-	-
アスコルビン酸添加**	0.02	110	103	-	-
海水	亜硫酸ナトリウム添加**	0.02	73.8	73.1	-
粗抽出液 (ジクロロメタン 溶液)	1	97.2	-	70.1	-
標準液	1	-	-	-	88.1
	10	-	-	-	109

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

** L(+)-アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム添加: 試料水 1 L 当たり 1 g を添加

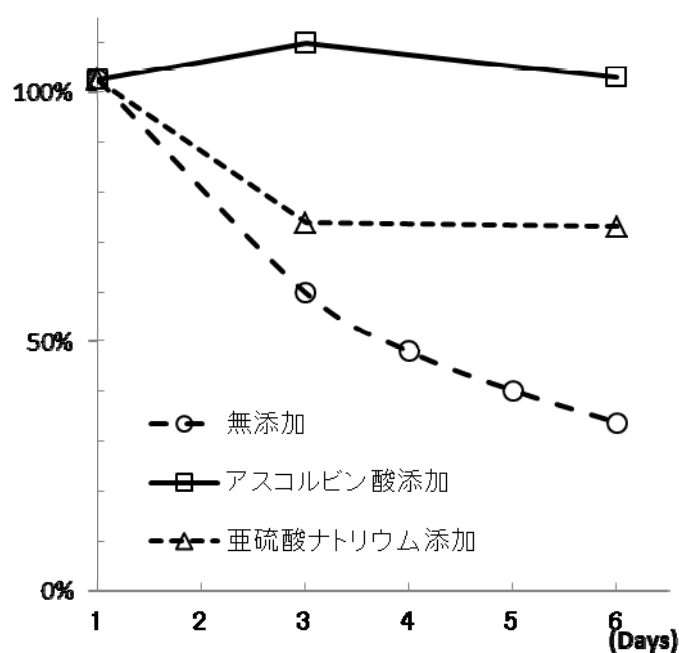


図 13 試料の保存性 (海水、添加試料 2 ng/100 mL)

〔操作ブランクの検討〕

試薬等に起因するブランクが認められたため、操作ブランクの検討を行った。塩化ナトリウム (和光純薬工業製 残留農薬・PCB 試験用) を添加した場合の操作ブランク (図 14)、精製水を用いた操作ブランク (図 15)、ジクロロメタン (和光純薬工業製 ダイオキシン類分析用) 濃縮工程以降の操作ブランク (図

16) からブランクが認められた。また、素手での操作も汚染源となり得るため、手袋の使用が望ましい。アセトニトリル及び窒素吹付の過程では、ブランクは認められなかった。(図 17)

塩化ナトリウムからブランクが検出されることから、塩化ナトリウムの添加は行わないこととし、ジクロロメタンは、ブランクが検出されなかった関東化学製 Primepure(M)グレードとした。

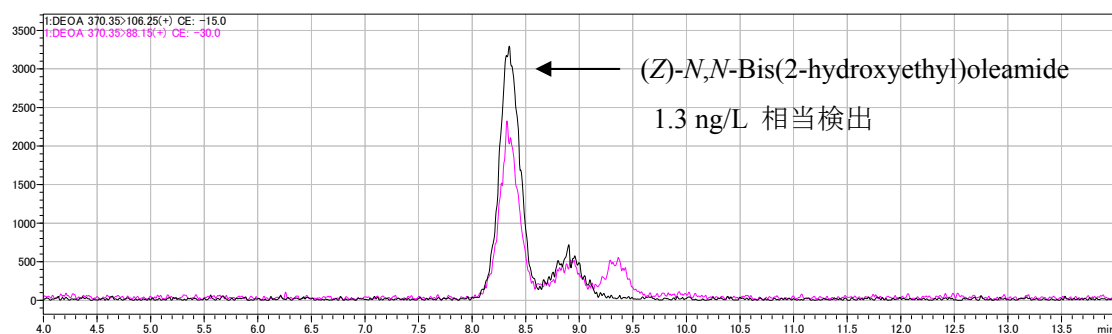


図 14 操作ブランクのクロマトグラム
(塩化ナトリウム+精製水+ジクロロメタン+アセトニトリル)

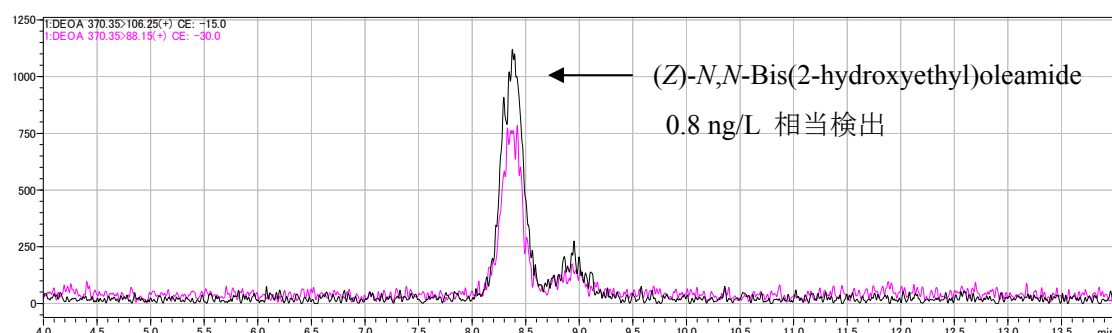


図 15 操作ブランクのクロマトグラム
(精製水 200 mL+ジクロロメタン+アセトニトリル)

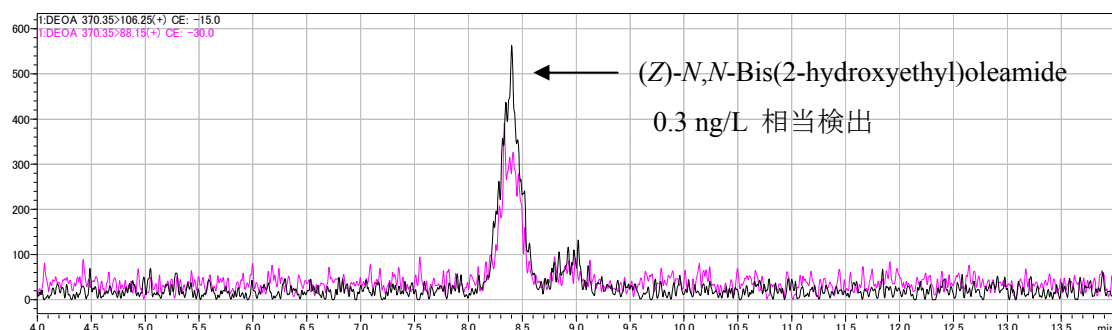


図 16 操作ブランクのクロマトグラム (ジクロロメタン+アセトニトリル)

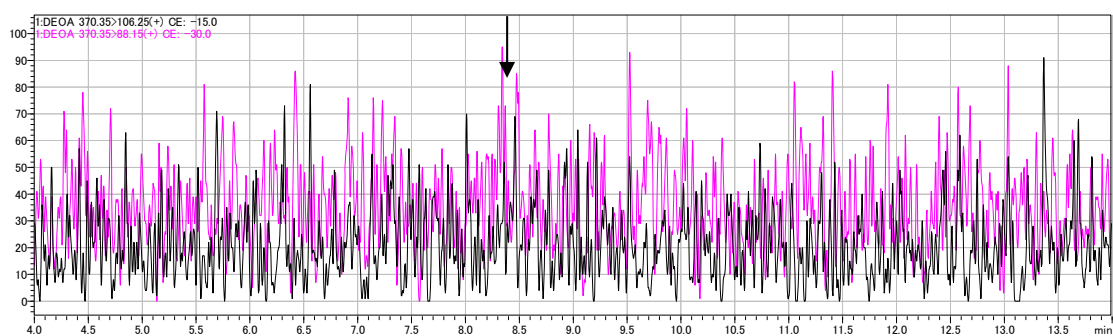


図 17 操作ブランクのクロマトグラム (アセトニトリル+窒素吹付)

〔振とう抽出の検討〕

精製水 100 mL に標準物質 200 ng を添加して、各溶媒で振とう抽出を行った。検出された量を回収率 (%)として表す。アセトニトリル及びジクロロメタン抽出で 80%以上の回収率が得られたが、操作ブランクを考慮してジクロロメタン抽出を採用し、塩析も行わなかった。

表 9 振とう抽出の検討結果

試料	試験数	添加量 (ng)	回収率 (%)	
			抽出 1 回目	抽出 2 回目
100 mL 精製水 + 30 g NaCl 30 mL アセトニトリル抽出	1	200	93.4	-
100 mL 精製水 10 mL ジクロロメタン抽出	1	200	90.0	-
100 mL 精製水 + 30 g NaCl 10 mL ジクロロメタン抽出	1	200	94.8	-
100 mL 精製水 10 mL ヘキサン抽出	1	200	8.7	-
100 mL 精製水 + 30 g NaCl 10 mL ヘキサン抽出	1	200	9.1	-
100 mL 精製水 10 mL ジクロロメタン抽出	2	10	82.4	1.9

〔LC 条件の検討〕

LC/MS 測定におけるグラジエント条件の検討を行った。メタノール系 (図 18)、アセトニトリル系 (図 19) の両条件下において、溶媒のみを注入しても、測定対象ピークの近傍に妨害となるピークが観察された。そこで、本分析法では、アイソクラティック条件での測定を採用した。

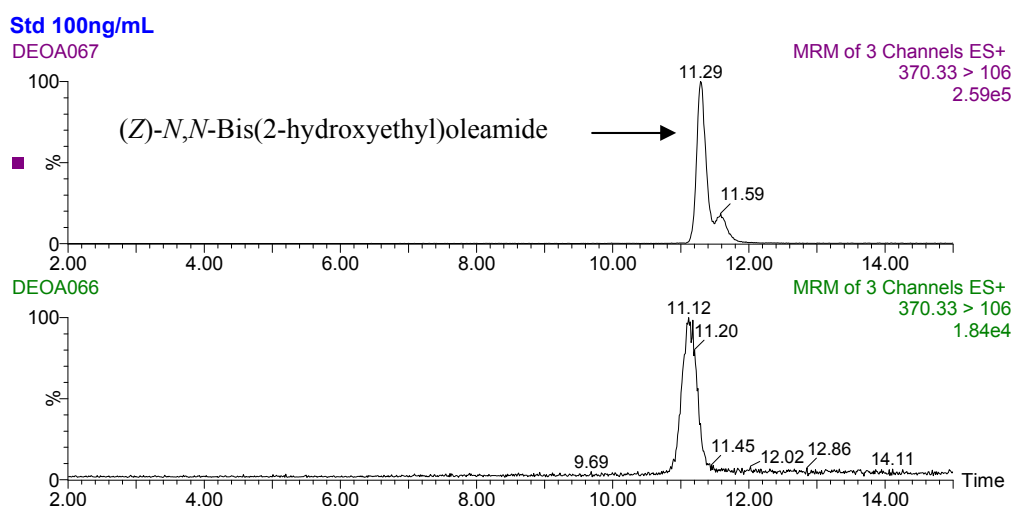


図 18 メタノール系グラジエント条件による測定
(標準物質 100 ng/mL 注入 (上)、メタノールのみ注入 (下))

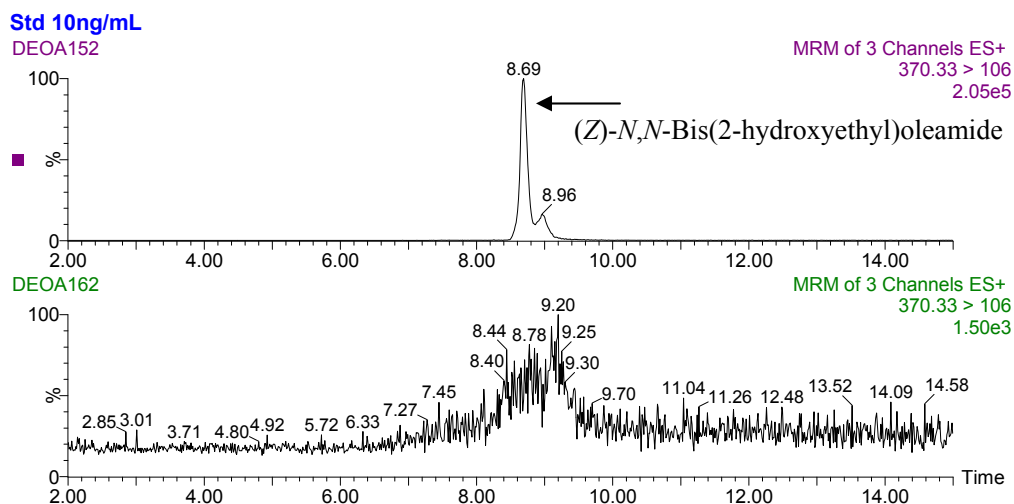


図 19 アセトニトリル系グラジエント条件による測定
(標準物質 10 ng/mL 注入 (上)、アセトニトリルのみ注入 (下))

〔固相抽出の検討〕

- (1) 精製水 50 mL に標準物質 10 ng を添加して、流速 20 mL/min で各固相に通液し、アセトニトリル及びアセトンで溶出を行った。検出された量を回収率 (%)として表す。

表 10 各固相カートリッジの検討結果 (回収率%)

固相	水 (通過分)	アセトニトリル	アセトン	計
		0-4 mL	4-8 mL	
Oasis HLB Plus	0.7	64.1	9.2	74.0
Sep-Pak PS2 Plus	15.8	53.8	20.1	89.7
Sep-Pak tC2 Plus	0.7	33.7	18.1	52.5
Sep-Pak C8 Plus	0.8	9.0	24.2	34.0
Sep-Pak C18 Plus	1.9	3.2	23.1	28.2

* 水 (通過分) : 固相を通過した精製水中に含まれる標準物質の量

- (2) 精製水 50 mL に対し標準物質 10 ng を添加して、流速 20 mL/min にて Oasis HLB Plus に通液し、逆方向よりアセトニトリルで溶出を行った。検出された量を回収率 (%)として表す。

表 11 固相カートリッジ(Oasis HLB Plus / BF)の検討結果 (回収率%)

通液した試料の液性	アセトニトリル		アセトニトリル 容器洗液	計
	0-4 mL	4-8 mL		
精製水	71.8	14.6	9.2	95.6
メタノール/精製水(1:9)	65.8	8.4	3.5	77.7
メタノール/精製水(2:8)	80.3	4.3	9.4	94.0

以上の結果より、20%メタノール含有試料を、固相カートリッジ Oasis HLB Plus に通水した後、アセトニトリル 8 mL をバックフラッシュにて溶出し、使用器具の洗液を合わせることで 90%以上の回収率を得られた。

固相抽出法は、振とう抽出法と同等の回収率が得られたが、操作の煩雑さ、使用器具への吸着等に起因するばらつきのため、本法では採用しなかった。

〔環境試料の分析〕

河川水（雷山川）より *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドは検出されなかった。（図 9）また、海水（大牟田沖）より痕跡レベルが検出された。（図 11）

【評価】

環境水中の *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドの定量分析法を開発した。本法の MDL は 1.3 ng/L、MQL は 3.3 ng/L であった。河川水を用いた添加回収試験（添加量 2.0 ng）における回収率は、98.4%（変動係数 7.2 %）であった。また、海水を用いた添加回収試験（添加量 0.2 ng）における回収率は、112%（変動係数 14.9 %）であった。福岡県内の河川水から *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドは検出されなかった。また、海水から痕跡レベルが検出された。以上の結果から、本法は環境水中に含まれる 1.0 ng/L オーダーの *N,N*-ジエタノールオレイン酸アミドの検出に適用可能であると判断される。

【担当者連絡先】

所属先名称：福岡県保健環境研究所

所属先住所：〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野 39

TEL：092-921-9948、FAX：092-928-1203

担当者名：飛石和大、塚谷裕子

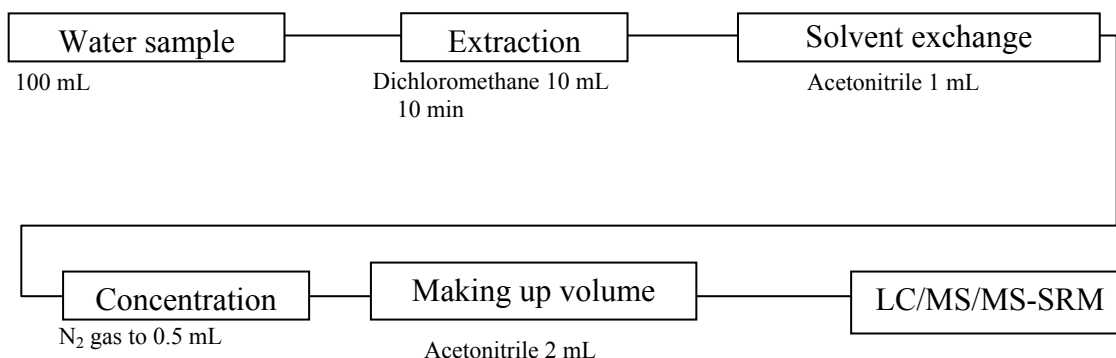
E-mail：tobiishi@fihes.pref.fukuoka.jp、tsukatani@fihes.pref.fukuoka.jp

(Z)-N,N-Bis(2-hydroxyethyl)oleamide

This method provides procedures for the determination of (Z)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)oleamide in water samples by liquid chromatography/quadrupole mass spectrometry (LC/MS). One hundred milliliters of water sample is extracted with 10 mL of dichloromethane using a separatory funnel. The dichloromethane layer which 1 mL of acetonitrile is added is concentrated to 0.5 mL with a nitrogen stream, and the sample solution is diluted to 2 mL with acetonitrile.

The analytes are determined in the selected-reaction-monitoring mode. The method detection limit (MDL) and the quantification limit (MQL) are 1.3 and 3.3 ng/L, respectively. The average recovery (n=5) from river water samples spiked with 2.0 ng of (Z)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)oleamide was 98.4 %, and the relative standard deviation was 7.2 %. And, that (n=7) from seawater samples spiked with 0.2 ng was 112%, and the relative standard deviation was 14.9 %.

Using this method, (Z)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)oleamide was detected at the trace level in seawater and not detected in river water in Fukuoka.



物質名	分析法フローチャート	備考
<i>N,N</i> -ジエタノール オレイン酸アミ ド	【水質】 <pre> graph LR A["水質試料 100 mL"] -- "ジクロロメタン 10 mL, 10 min" --> B["振とう抽出"] B --> C["転溶 アセトニトリル 1 mL"] C --> D["濃縮 N₂ 気流下 0.5 mL まで"] D --> E["定容 アセトニトリル 2 mL"] E --> F["LC/MS/MS-SRM"] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM 検出下限値： 【水質】(μg/L) 0.0013 分析条件： LC： 島津製 Nexera X2 カラム： Waters 製 XBridge C18 (2.1×150mm, 3.5μm) MS： 島津製 LCMS-8050