

1. 目的

フェニルヒドラジンの ACGIH の TLV は 0.1ppm、OSHA の PEL は 5ppm となっている。このことから本検討では、最も濃度の低い ACGIH の TLV を十分に定量できる測定分析法の検討を行なった。

2. フェニルヒドラジンについて

検討の対象であるフェニルヒドラジンの物理的性質を表-1 に示した。また、図-1 にフェニルヒドラジンの構造を示した。

表-1 フェニルヒドラジンについて (ICSC より抜粋)

物理的性質	
CAS 番号	100-63-0
沸点	243.5°C
融点	19.5°C
比重(水=1)	1.1
蒸気圧	14.5kPa (20°C)
分子量	108.1

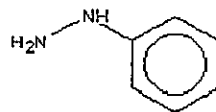


図-1. フェニルヒドラジンの構造式

フェニルヒドラジンは、染料、医薬、医薬中間体、合成中間体、糖・アルデヒド・ケトンの検出用試薬、金属沈殿用分析などに使用され、日本においてはフェニルヒドラジン自体としては1社(住友化学)が製造している(15509の化学商品、化学工業日報社)。

物性としては、ヒドラジン、N,N-ジメチルヒドラジンに比べ、活性な芳香族アミノ基を有しているため反応性に富み、酸化され易い特徴を有している(和光純薬工業 MSDS より)。

3. 捕集法・分析法について

フェニルヒドラジンの捕集法・分析法については、以下のものが公開されている。

表-2. 公開されているフェニルヒドラジン関連の捕集法・分析法

対象物質	方法名	対象媒体	捕集法	分析法	感度
フェニルヒドラジン	NIOSH 3518	空気	ミゼットイペンジャー	リン酸モリブデン錯体 比色法	1.1-11ppm(100L)
フェニルヒドラジン N,N-ジメチルヒドラジン	環境省 1984年化学 物質分析法 開発調査報 告書	河川水	抽出	カルブール誘導体化 GC/MS	?
ヒドラジン	NIOSH 3503	空気	バブラー(0.1N塩酸)	ベンズアルデヒド誘導体化 比色法	0.07-3ppm(91L)
ヒドラジン	OSHA 108	空気	硫酸含浸2段フィルター	ベンズアルデヒド誘導体化 HPLC/UV	0.000058ppm(240L)
ヒドラジン	OSHA 20	空気	硫酸含浸Gas Chrom R	ベンズアルデヒド誘導体化 HPLC/UV	0.0012ppm(20L)

表-2 に示したように、ヒドラジンについては OSHA method 108 により、高感度の捕集・分析法が開発されているが、N,N-ジメチルヒドラジン及びフェニルヒドラジンについては、TLV の 1/100 程度の感度を有する捕集・分析法は開発されていないと言える。N,N-ジメチルヒドラジンについては、捕集は OSHA method 108 で行い誘導体化は上記の河川水の方法を応用し、良好な結果(ヒドラジン及びN,N-ジメチ

ルヒドラジンの同時分析について)を得たが、フェニルヒドラジンについてはその反応性のため安定的な結果を得られなかった。

4. 検討内容

今回は NIOSH method 3518 (0.1M 塩酸 15mL を用いたミジェットインピンジャー捕集—比色法)を参考に、フルフラール誘導体化に硫酸を用いることを考慮し、0.1M 硫酸 15mL を用いたミジェットインピンジャー捕集—HPLC 分析について検討を行った。

5. 試薬

今回の検討で使用した試薬は以下の通りである。

- ① フェニルヒドラジン：和光純薬工業製、特級、99%、比重 1.094.
- ② フルフラール：東京化成工業製、特級、98.0%.
- ③ 硫酸：関東化学製、精密分析用、97%.
- ④ 酢酸ナトリウム 3 水和物：和光純薬工業製、特級、99.0%.
- ⑤ ノルマルヘキサン：和光純薬工業製、HPLC 用、96%.
- ⑥ イソプロピルアルコール：和光純薬工業製、HPLC 用、99.7%.
- ⑦ アセトニトリル：和光純薬工業製、HPLC 用、99.8%.
- ⑧ 水：超純水.

6. 分析

6-1. 誘導体化条件

捕集液は 0.1M 硫酸であることを考慮し、使用液量は試料液 3mL、誘導体化試薬液量 1.5mL とし、誘導体化試薬 (4%フルフラール+酢酸ナトリウム) の最適濃度を、酢酸ナトリウム濃度 0.2M、0.4M および 0.6M について検討したところ、0.6M 酢酸ナトリウム溶液に 4%フルフラールを調整したものが最も高いレスポンスを与えることから、誘導体化は (4%フルフラール+0.6M 酢酸ナトリウム) 水溶液とした。誘導体は水系溶媒中では安定ではないため、ノルマルヘキサン 1.5mL により抽出を行った。なお、誘導体化時間は参考文献 (昭和 59 年度化学物質分析法開発調査報告書・環境庁環境保健部保健調査室) に従い 2 時間とした。

6-2. 分離分析条件

フェニルヒドラジンのフルフラール誘導体フルアルデヒトフェニルヒドラゾン (図-2、CAS. No. 2216-75-3) はシス体、トランス体が存在するが、NIST (National Institute of Standards Technology, U.S.A.) のマスライブラリーでは異性体の区別はなく 1 つのマススペクトルのデータのみが公開されている。GC/MS においても分離挙動、感度を調べたが HPLC のそれら以下であったので、今回は抽出溶媒がノルマルヘキサンであることから、順相 HPLC 分析により検討を行なった。

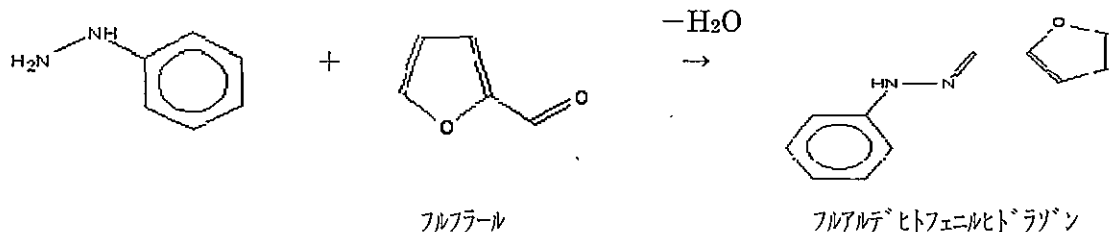


図-2. フルフラールとの誘導体化反応

6-3. 検量線

0.1M 硫酸にフェニルヒドラジン 100 μ L を溶解し、これを標準原液 1083 μ g/mL とした。これを順次 0.1M 硫酸で希釈し、0、1.08、2.71、5.42、10.8、27.1、54.2、81.2、および 108.3 μ g/mL の標準溶液を調整した。それぞれの 3mL をスクリーキャップ付 10mL 試験管に取り、4%フルフラ

ールー0.6M 酢酸ナトリウム水溶液 1.5mL を加え密栓して 2 時間放置した。その後、1.5mL のノルマルヘキサンを加え液々分配、次いで 3000r.p.m. で 10 分間遠心分離を行った。上澄みのノルマルヘキサン相を分取し分析に供した。

6-4. 保存性

0.1M 硫酸に溶解したフェニルヒドラジン 2.708、10.83 および 27.08 ($\mu\text{g/mL}$) の溶液 15mL をそれぞれ 5 サンプル、インピンジャーに入れ、1.0L/min. で 30 分空気を捕集した後遮光冷蔵保存し、0 日目、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に分析し、採気しない時の濃度を 100 としその変化を百分率で調べた。(最低濃度を 2.708 ($\mu\text{g/mL}$) としたのは、7-2 および 7-3 に示すように誘導体の異性体微量成分の推移も調べるためである。)

7. 結果

7-1. HPLC 分析条件

通常順相分析に用いられる溶媒ノルマルヘキサン-イソプロピルアルコール、酢酸エチル-イソプロピルアルコールの組み合わせを用いて、シリカゲルカラムで分離挙動と感度を検討した。最終的には試薬成分と誘導体との分離が最も重要な因子であった。分析装置および分析条件は表-3 に示す。図-3 および 4 に標準溶液濃度 0 および 10.83 ($\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラムの一例をそれぞれ示す。図中 PH-1 および PH-2 とあるのは、それぞれ誘導体の微量成分および主成分を示す。また、標準溶液 10.83 ($\mu\text{g/mL}$) を分析した際の PH-1 および PH-2 のオンライン UV スペクトルをそれぞれ図-5 および 6 に示す。

表-3. 分析装置と分析条件

分析機器	Agilent Technology製 高速液体クロマトグラフ 1100シリーズ
検出器	DAD検出器
検出波長	340nm (bandpass 20nm)
カラム	Agilent Technology製 ZORBAX Rx-SIL ($5\mu\text{m}$) 4.6mm (i.d.) x 25cm (length)
カラム温度	40°C
移動相	n-Hexane / isopropyl alcohol = 99 / 1 (v/v%)
流量	1.0 mL/min.
試料注入量	5 μL

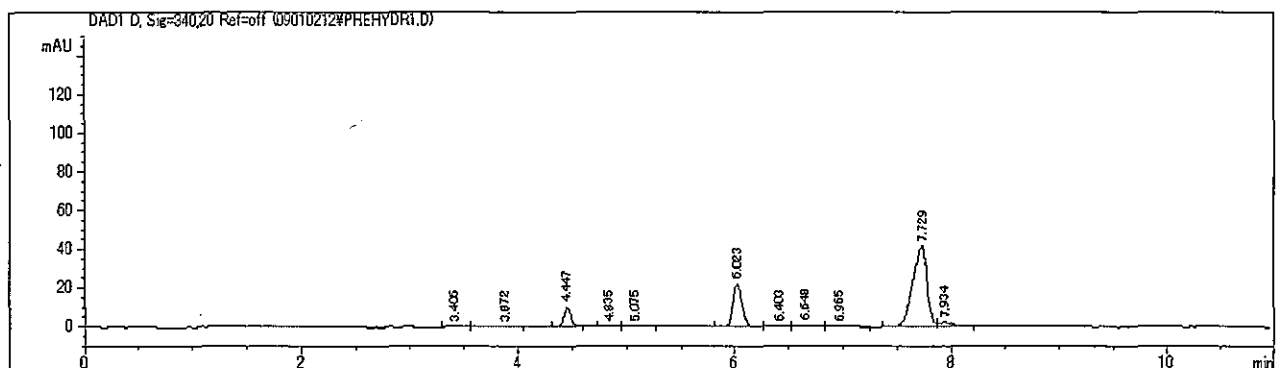


図-1. 標準溶液 0 ($\mu\text{g/mL}$) (試薬ブランク) のクロマトグラムの一例

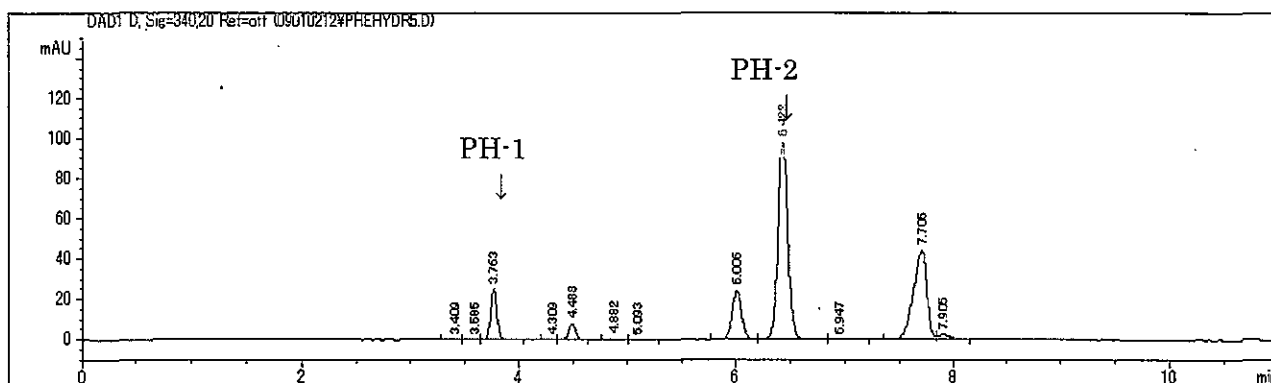


図-4. 標準溶液 10.83 ($\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラムの一例

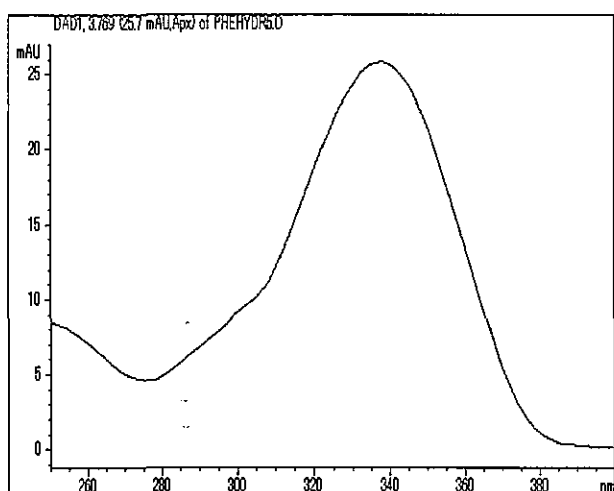


図-5. PH-1 のオンライン吸収スペクトル

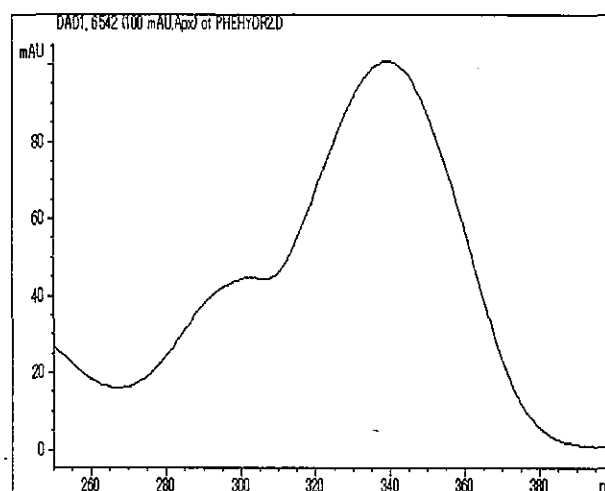


図-6. PH-2 のオンライン吸収スペクトル

7-2. 検量線

図-7に検量線の一例を示す。異性体の判別は出来ないが、いずれもこの濃度範囲で直線性が確認された(フェニルヒドラジン 108.3 ($\mu\text{g/mL}$) では主成分 (FH-2) は直線から外れるのが確認された)。このことからこの濃度範囲では異性体の組成比は一定であり、傾きの比からその比は 0.13 : 0.87 と算出された。この値を仕込み濃度に乗じて、補正したのが図-8の検量線である。シス体とトランス体の組成比は、異なる5日間の分析で微量成分が 12.32%、12.99%、12.45%、12.41%、13.02%と平均 12.6% (標準偏差 0.3、変動係数 2.7%)、主成分が 87.66%、87.01%、87.55%、87.59%、86.98%と平均 87.4% (標準偏差 0.3、変動係数 0.4%) と実験誤差内で一定、即ち同じ感度を有することが分かる。

以上から、定量は主成分について行い、その値にファクター (1/0.87) を乗ずれば良いことが分かる。

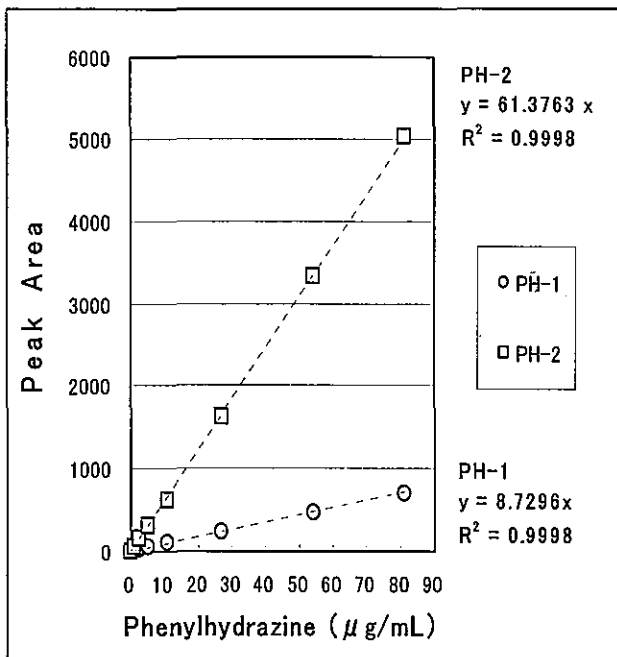


図-7. フェニルヒドラジンの検量線

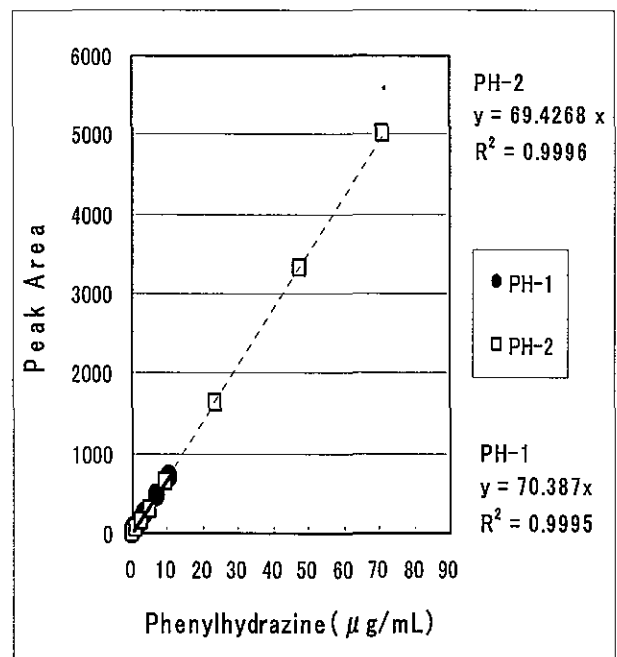


図-8. フェニルヒドラジンの補正検量線

7-3. 保存性

表-3 および図-7 に保存性の結果を示す。今回のデータは、補正検量線で成分毎に分析した結果を示した。いずれの濃度においても、遮光冷蔵保存で7日目までは86%以上と良好であった。

表-4. 保存性試験結果

濃度		仕込み日	採気後直後	1日後	3日後	5日後	7日後
2.708 (μg/mL)	N=	-	5	5	5	5	5
	average	100(%)	93.88	89.16	91.47	86.09	88.96
	s.d.	-	1.18	1.35	1.9	1.61	2.05
	c.v.(%)	-	1.25	1.51	2.07	1.87	2.31
10.83 (μg/mL)	N=	-	5	5	5	5	5
	average	100(%)	104.0	99.96	99.42	97.59	100.7
	s.d.	-	0.73	2.08	2.92	1.47	1.02
	c.v.(%)	-	0.71	2.08	2.94	1.50	1.01
27.08 (μg/mL)	N=	-	5	5	5	5	4
	average	100(%)	107.5	102.4	103.1	100.6	103.3
	s.d.	-	0.66	0.35	0.47	1.19	1.4
	c.v.(%)	-	0.61	0.34	0.45	1.18	1.36

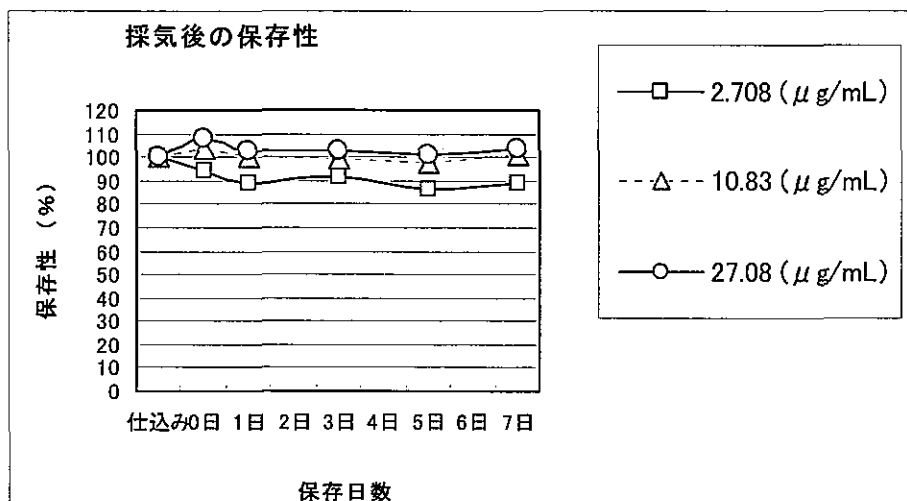


図-9. 保存性

7-4. 定量下限

検量線の最小濃度 2 点 1.083 および 2.708 ($\mu\text{g/mL}$) についてそれぞれ 10 点誘導体化を行ない、繰り返し分析を行なった。その結果を表-4 に示す。主成分 FH-2 を用いて定量下限を算出した。いずれの濃度でも同程度の値が得られた。分析感度的には十分な定量下限濃度であるが、インピンジャー捕集による捕集液量 15mL が大きな要因となり、最終的な気中濃度では 1 L/min、30 分採気で ACGIH-TLV (TWA) 0.1ppm の 1/6 (0.016ppm)、90 分で 1/19 (0.005ppm) となった。

表-5. 定量下限

PH-2	1.083($\mu\text{g/mL}$)	2.708($\mu\text{g/mL}$)	Factor
	Area	Area	
1	48.30	136.82	
2	49.26	139.44	
3	49.98	138.94	
4	51.80	140.26	
5	52.82	138.06	
6	50.27	135.94	
7	50.29	137.75	
8	50.50	138.44	
9	52.24	138.86	
10	53.76	134.28	
average	50.92	137.88	
s.d.	1.69	1.78	
3xs.d.	5.07	5.34	
($\mu\text{g/mL}$)	0.07	0.09	x(1/0.87)
(μg)	0.55	0.69	x(1.5x(15/3)x1/0.87)
10xs.d.	16.90	17.76	
($\mu\text{g/mL}$)	0.28	0.30	x(1/0.87)
(μg)	2.10	2.28	x(1.5x(15/3)x1/0.87)

1.5mL抽出

定量下限(1.083 $\mu\text{g/mL}$ で算出)

1L/minで30分採気の場合

$$(2.10(\mu\text{g})/1000)/((1.0 \times 30\text{min})/(1000)) \times 24.47/108.14 = 0.016\text{ppm}$$

7-5. 追加検討

7-5-1.

前回の検討時、フェニルヒドラジン誘導体を逆相系で分析した検量線の傾きが 5 μL 注入換算で約 110 (area $\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$) で、今回が約 85 (area $\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$) であったことから分析感度そのものは逆相系の方が高いと推定される。更に感度上昇を図るため、試料液量 6mL、誘導体化試薬液量 3mL で誘導体化後ノルマルヘキサン 3mL で液々分配を行いその 2.4mL を分取し、35°C以下の温浴中で窒素気流下濃縮乾固した後、逆相系 HPLC 分析の溶媒-アセトニトリル-0.5mL に溶媒置換して分析を行なった。その際の分析条件を表-6、クロマトグラムを図-10(a)および (b) にそれぞれ示す。

表-6. 逆相 HPLC 分析での分析条件

分析機器	高速液体クロマトグラフ Agilent社製1100シリーズ
検出器	フォトダイオードアレイ検出器
カラム	TSK-gel ODS-100S 2.0mm(i.d.)x25cm(L)(5 μm) (東ソー社製)
移動相	水/アセトニトリル=55/45(v/v%)
流量	0.2mL/min
試料注入量	5. μL
検出器波長	フェニルヒドラジン 340 nm
	N,N-ジメチルヒドラジン 300 nm
	ヒドラジン 335 nm
bandpass	20 nm

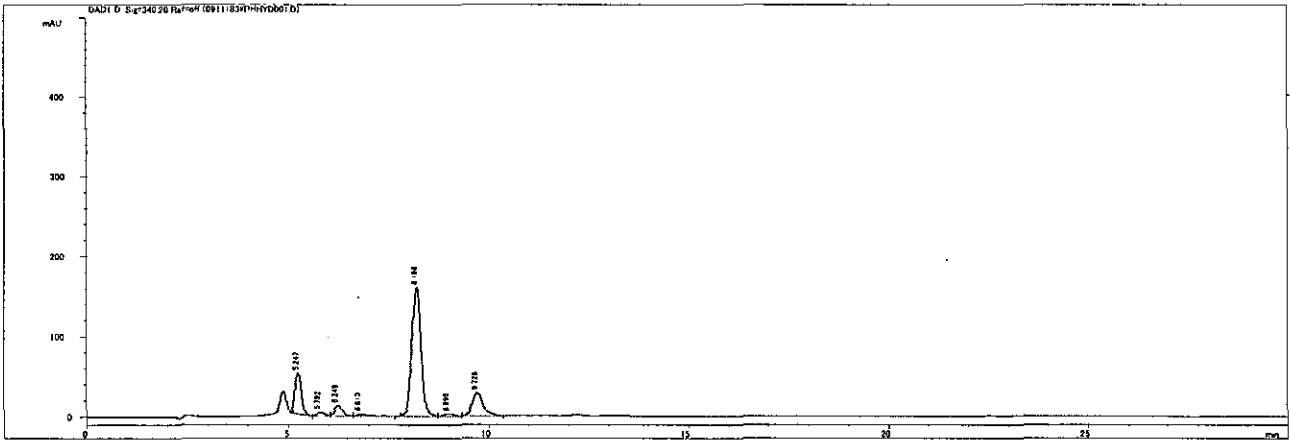


図-10 (a) 標準溶液 0 μg/ml (試薬ブランク) のクロマトグラム

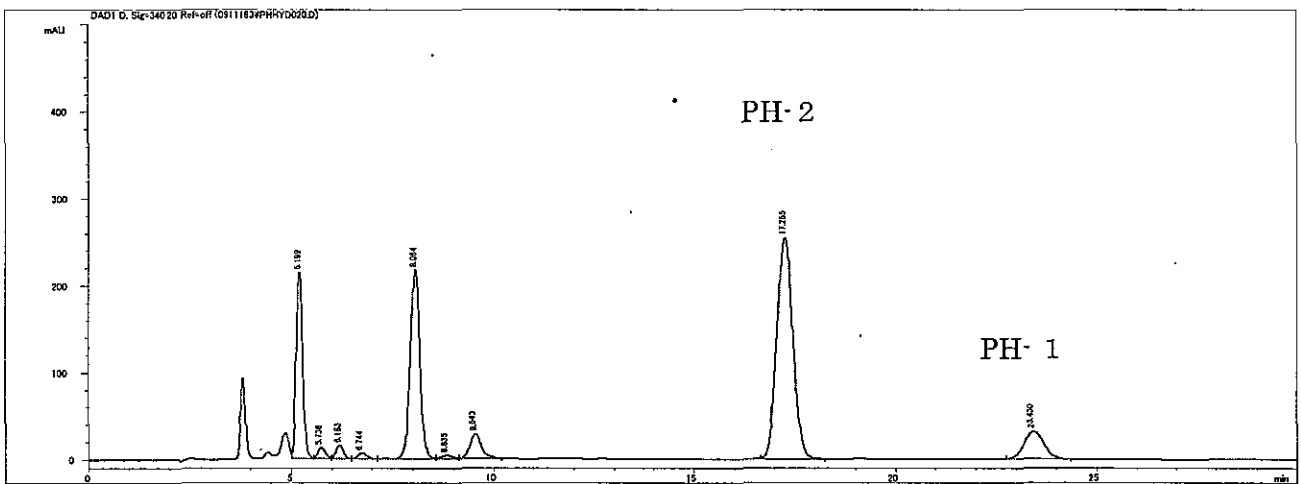


図-10 (b) 標準溶液 10.83 μg/mL のクロマトグラム

また、図-11 (a) および (b) に、その際のオンライン UV スペクトルをそれぞれ示す。

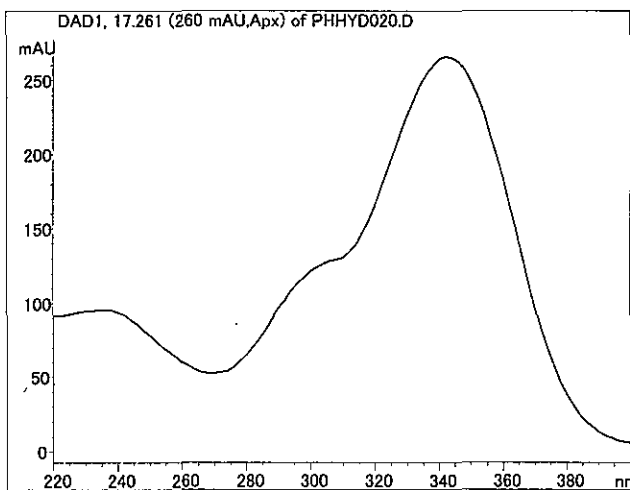


図-11 (a) PH-2 のオンライン吸収スペクトル

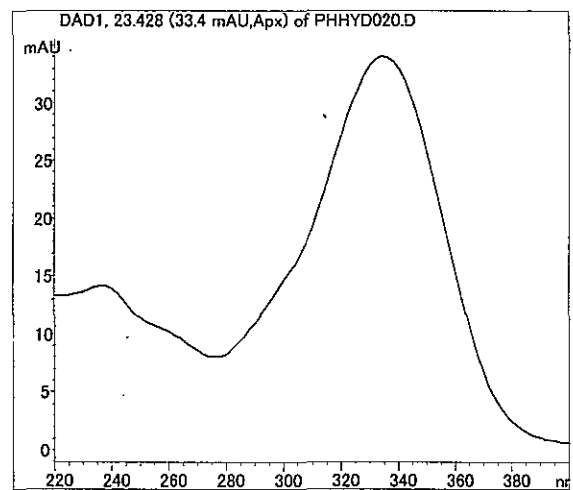


図-11 (b) PH-1 のオンライン吸収スペクトル

検量線についても、7-2. で示したのと同様にして、図-12 (a) 及び (b) にそれぞれ示す。

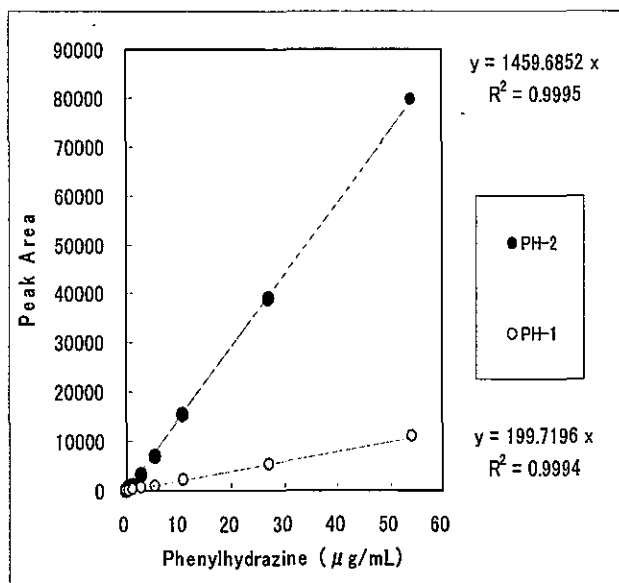


図-12(a) フェニルヒドラジンの検量線 (逆相)

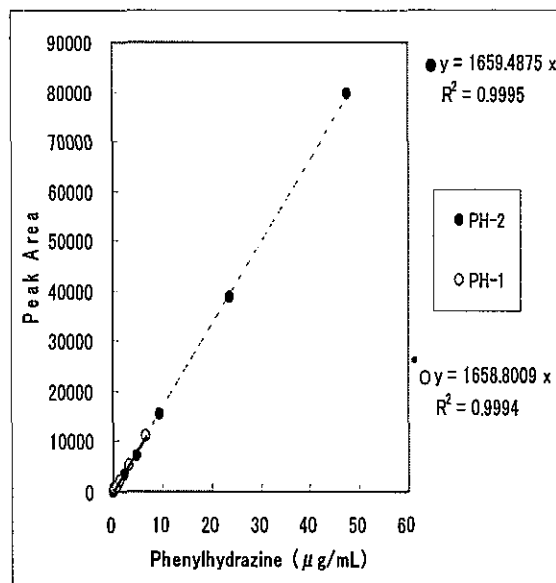


図-12(b) フェニルヒドラジンの補正検量線 (逆相)

検量線の傾きから、濃縮の効果 4.8 倍 (抽出液 2.4mL を 0.5mL に濃縮)、及び順相から逆相に条件変更したことにより、定量下限比で約 10 倍の感度アップとなった。また、主成分 (PH-2) と微量成分 (PH-1) の傾きの比は、88.0 : 12.0 となり、順相系分析と濃縮・逆相分析ではその成分組成差は 1% 以内であった。

以上から、濃縮-逆相分析の方がやや煩雑ではあるが、より高感度測定が可能であることが分かった。表-7 に定量下限濃度を示した。

表-7. 濃縮-逆相分析での定量下限

0.542 µg/mL	PH-2	PH-1	Factor
	Area	Area	
0.5-1	487.92	83.94	
0.5-2	519.66	83.33	
0.5-3	500.15	78.10	
0.5-4	459.16	76.79	
0.5-5	487.24	78.32	
average	490.83	80.10	
s.d.	22.04	3.29	
c.v.(%)	4.49	4.11	
3xs.d.	66.11		
3xs.d.(µg/mL)	0.045		x1/0.8796
3xs.d.(µg)	0.07		x0.5x(3/2.4)x(15/6)x1/0.8796
10xs.d.	220.36		
10xs.d.(µg/mL)	0.151		1/0.8796
10xs.d.(µg)	0.236		x0.5x(3/2.4)x(15/6)x1/0.8796

定量下限 (1L/min.x30分)
 $(0.236/1000)/(1.0 \times 30/1000) \times 24.47/108.14$
 $= 0.0018(\text{ppm})$

8. まとめ

別紙に、フェニルヒドラジンの測定・分析法として、インピンジャー捕集-フルフラール誘導体化-抽出-濃縮-逆相分析でのマニュアルを纏めた。なお、インピンジャー捕集であるので、空気吸引による捕集液の損失を考慮し、最大限の採気量を 120L とした。

9. 担当機関

中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター

フェニルヒドラジン標準測定分析法

構造式 C ₆ H ₅ NHNH ₂		CAS No.: 100-63-0
許容濃度等 : ACGIH TLV : 0.1ppm OSHA PEL : 5ppm NIOSH C : 0.14ppm/120min.		物性等 分子量 : 108.14 比重 : 1.098 沸点 : 243.5°C (分解) 融点 : 19.5°C
別名 hydrazinobenzene, hydrazine-benzene		
サンプリング		分析
<p>サンプラー : ミジェットインピンジャー (15mL、0.1M 硫酸)</p> <p>サンプリング流量 : 0.2~1.0L/min サンプリング時間 : 採気量(MAX) : 120L</p> <p>保存性 : 通気後 (30L) 遮光冷蔵保存で7日目まで で、 2.71 μg/mL、86% (0日比) 10.8 μg/mL、100% (0日比) 27.1 μg/mL、100% (0日比) ブランク : 検出せず</p>		<p>分析方法 : HPLC-UV 法 誘導体化 : 捕集液または標準液 6mL に 4%フル ラル水溶液 (含 0.6M 酢酸ナトリウム) 3mL を 加え 2 時間放置。その後、3mL n-ヘキサン を加え抽出する。3000r.p.m. で 10 分間 遠心分離。ヘキサン相を 2.4mL 分取し、35°C 以下の温浴中で、窒素気流下濃縮する。 アセトニトリル 0.5mL に転溶し、HPLC 分析する。</p> <p>機器 : HPLC1100 シリーズ (Agilent 社製) 検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 カラム : TSK-gel ODS 100S (2.0mm(i.d.)x25cm(Lengh) (5 μm) 移動相 : 水/アセトニトリル=55/45 (V/V%)</p> <p>カラム温度 : 40°C 流量 : 0.2mL/min 試料導入量 : 5 μL 波長 : 340nm (bandpass 20nm) 検量線 : 100 μL を 0.1M 硫酸 100mL に溶解した ものを、標準原液 (1083 μg/mL) とす る。以下の溶液を誘導体化、抽出、 濃縮し、検量線とする。 0 μg/mL 1.08 μg/mL 2.71 μg/mL 5.42 μg/mL 10.8 μg/mL 27.1 μg/mL 54.2 μg/mL</p> <p>定量法 : 絶対検量線 注意 : 要時調整</p>
精度		
<p>検出下限 (3σ) 0.045 μg/mL 定量下限 (10σ) 0.151 μg/mL</p> <p>定量下限気中濃度 0.0036 ppm (採気量 10L) 0.0018 ppm (採気量 30L) 0.0009 ppm (採気量 60L) 0.0005 ppm (採気量 120L)</p>		
適用 : 同誘導体化にてヒドラジン、N, N-ジメチルヒドラジンも分析可能		
注意 : (1) 空気、光により酸化されるので遮光、冷蔵保存する。また、インピンジャーの擦り合わせ部をパラフィルム等で密封する。 (2) 誘導体はシス体、トランス体の 2 種に分離され、メインピークの面積比は 87% である。		
参考文献 : 昭和 59 年度化学物質分析法開発調査報告書 (環境庁環境保健部保健調査室)		

作成日 2010/2/28

1- プロモブタン分析測定法に関する検討結果

平成 22 年 2 月 26 日

測定・分析手法検討チーム
中央労働災害防止協会