

o-フェニレンジアミンの分析測定法に関する検討結果

1. 目的

o-フェニレンジアミン (o-PD) は、主に、アゾ染料、白髪染料、ゴム加硫促進剤、写真現像薬原料に使用されており、ばく露防止および保護措置における管理濃度は現在未設定である。許容濃度は、日本産衛学会および ACGIH TLV-TWA とともに $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ に設定されている。本検討では許容濃度 ($0.1\text{mg}/\text{m}^3$) の $1/1000 \sim 2$ 倍相当の濃度範囲を分析できる手法について検討する。

2. o-フェニレンジアミンの物性等

表 1 に o-PD の物性¹⁾ および許容濃度²⁾、図 1 に構造式を示す。

表 1. 物性および許容濃度

物質名	o-フェニレンジアミン
別名	o-ジアミノベンゼン 1,2-ベンゼンジアミン
化学式	$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$
分子量	108.14
CAS番号	95-54-5
外観	茶～黄色の固体
比重(密度)	$1.14\text{g}/\text{cm}^3$ (20)
沸点	256 ~ 258
融点	103 ~ 104
蒸気圧	1.3Pa (20)
溶解性(水)	$31.1\text{g}/\text{L}$ (20)
オクタール/水分配係数	$\log \text{Pow} = 0.15$
許容濃度	ACGIH TLV-TWA = $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ 日本産衛学会 = $0.1\text{mg}/\text{m}^3$

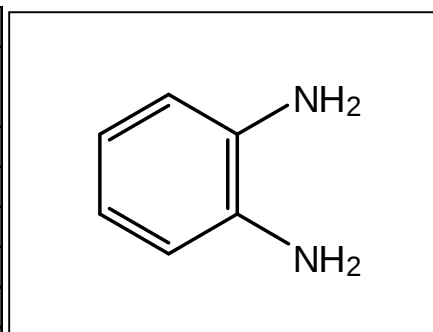


図 1. 構造式

3. 分析方法に関する文献調査

o-PD は、OSHA 分析法 87 および作業環境測定の方法 (オルトフェニレンジアミン及びその塩分析法) にて、ろ過捕集方法-HPLC 分析方法が示されている。サンブラは硫酸含浸ガラス繊維ろ紙を 2 枚保持したカセット型サンブラを使用し、捕集ポンプで室内空気を $1\text{L}/\text{min}$ で 10 分間、吸引している。脱着方法は、硫酸含浸ガラス繊維ろ紙 (各々 1 枚づつ) に $0.1\text{g}/\text{L}$ EDTA 水溶液を 3mL 添加し、攪拌・静置の後、上澄み液を回収し、HPLC にて測定している。本報告では、基本的な方法は両分析方法に準拠しつつ、標準原液や標準溶液の調製方法、ばく露実態調査において o-PD 以外の化学物質も捕集されることを想定し、HPLC による o-PD とその他の酸化染料の分離を検討した。

4. 予備検討

4-1. 標準原液および標準溶液の調製方法

OSHA 分析法 87 および作業環境測定の方法では、o-PD を 10N 硫酸で溶解し 2000 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製している。これに対し、標準溶液は、上記の標準原液を 0.1g/L EDTA 水溶液にて希釈している。この方法は、希釈倍率によって標準溶液の酸濃度が変わるため、o-PD の解離状態が不安定になり保持時間が変化する（図 2-1）。そこで、標準原液および標準溶液の希釈溶媒を、脱着後の溶液と同じ酸濃度（0.1g/L EDTA 溶液 + 硫酸 0.10%）になるよう調製した。この標準溶液を HPLC にて測定したところ、o-PD の保持時間が安定することを確認した。なお、この標準原液は冷蔵保存にて約 1 カ月間安定であった。

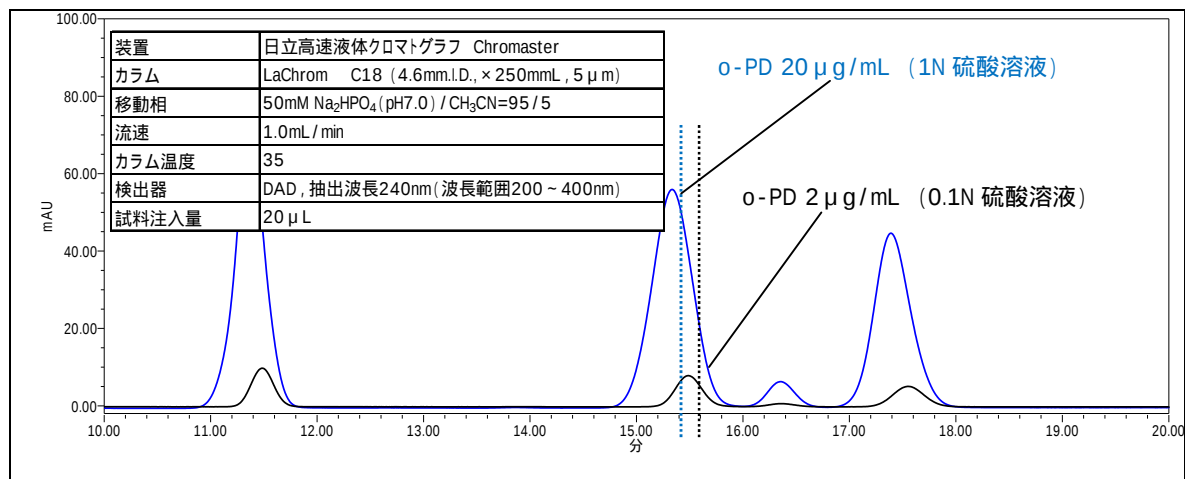


図 2-1 . 標準溶液希釈倍率の酸濃度による o-PD の保持時間

4-2 . HPLC による o-PD とその他の酸化染料の分離確認

ばく露実態調査において、o-PD 以外の化学物質が捕集されることを想定し、o-PD と他の酸化染料の分離を確認した。確認方法は、HPLC 移動相緩衝液を pH3, 7, 9, 10 に調製し比較した。カラムは pH レンジ 1-12 までの溶液を通液できる LaChrom C18 (4.6mmI.D., ×250mmL, 5 μm (日立ハイテクサイエンス製)) を用いた。pH7 に調製した緩衝液を用いることで、o-PD と他の酸化染料が完全に分離することを確認した（図 2-2）。

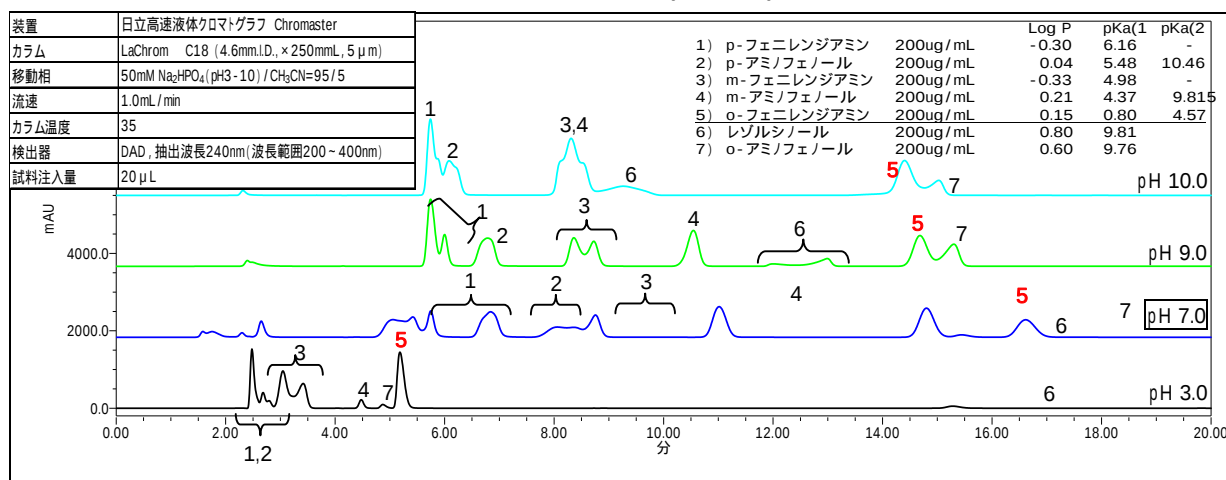


図 2-2 . o-PD とその他の酸化染料の分離(緩衝液 pH3, 7, 9, 10)

5. 分析方法

予備検討結果より、分析条件を以下の通りとした。

5-1. 試薬

検討には表 2-1 に示す試薬を使用した。

表 2-1. 試薬詳細

試薬名	メーカ	グレード	純度
o-フェニレンジアミン	和光純薬工業(株)	一級	95.0%
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	和光純薬工業(株)	特級	99.5%
硫酸	和光純薬工業(株)	特級	98.0%
リン酸水素二ナトリウム(無水)	和光純薬工業(株)	特級	99.0%
リン酸	和光純薬工業(株)	特級	85.0%
アセトニトリル	和光純薬工業(株)	HPLC用	99.8%

1) 0.10%硫酸含有 EDTA 水溶液

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを 0.13g 秤量し約 800mL の純水で溶解した。そこへ硫酸を 1020 μ L 添加し 1000mL に定容した。なお、この水溶液の pH は 1.63 であった。

2) o-PD 標準原液

o-PD を 20mg 秤量し 0.10%硫酸含有 EDTA 水溶液で 10mL に定容した。この標準原液中の o-PD 濃度は 2000 μ g/mL である。

3) o-PD 標準溶液

標準溶液は表 2-2 の濃度になるよう 0.10%硫酸含有 EDTA 水溶液で適宜希釈し調製した。

表 2-2. 標準溶液濃度の詳細

標準溶液濃度 (μ g/mL)										
0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100	200

4) EDTA 水溶液

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを 0.13g 秤量し純水で溶解し 1000mL に定容した。この水溶液の pH は 5.18 であった。

5) HPLC 移動相緩衝液 (50mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0))

リン酸水素二ナトリウム (無水) を 7.10g 秤量し、約 950mL の純水で溶解する。そこへ pH を確認しながら 85% リン酸を少量ずつ添加し、pH を 7.0 に調製の後、1000mL に定容した。

5-2. 装置および測定条件

装置および測定条件を表 3 に示す。

表 3 . 装置および測定条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
カラム	LaChrom C18 (4.6mm.I.D., × 250mmL , 5 μ m)
移動相	50mM Na ₂ HPO ₄ (pH7.0) / CH ₃ CN=95 / 5
流速	1.0mL / min
カラム温度	35
検出器	DAD , 抽出波長240nm (波長範囲200 ~ 400nm)
試料注入量	50 μ L

5-3. 捕集条件

1) 捕集ポンプ

捕集ポンプは Air Check2000 (SKC 製) を用いた。

2) サンプラ

サンプラは、硫酸含浸ガラス繊維ろ紙 (ガステック製、特注品) 2 枚を用い、図 3 に示す 2 層式のカセット型サンプラを使用した。

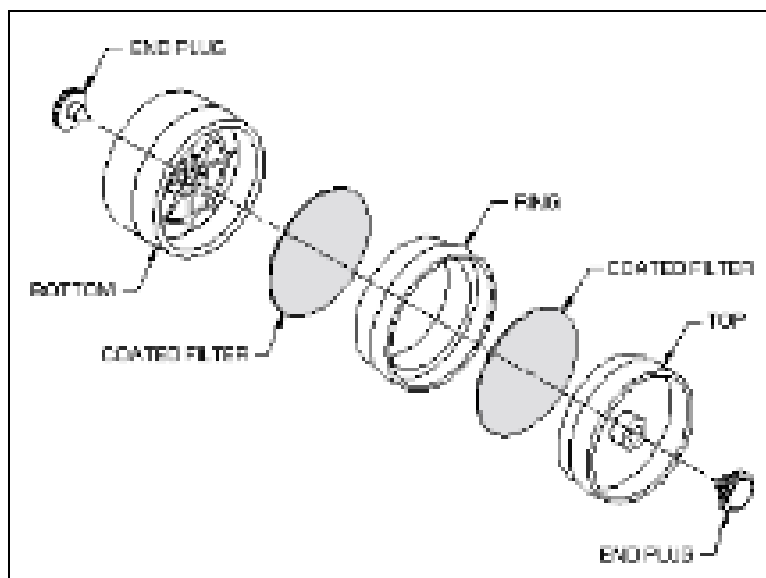


図 3. カセット型サンプラ (硫酸含浸ガラス繊維ろ紙 2 層式)

3) 溶媒脱着方法

図 4 に溶媒脱着方法フローを示す。

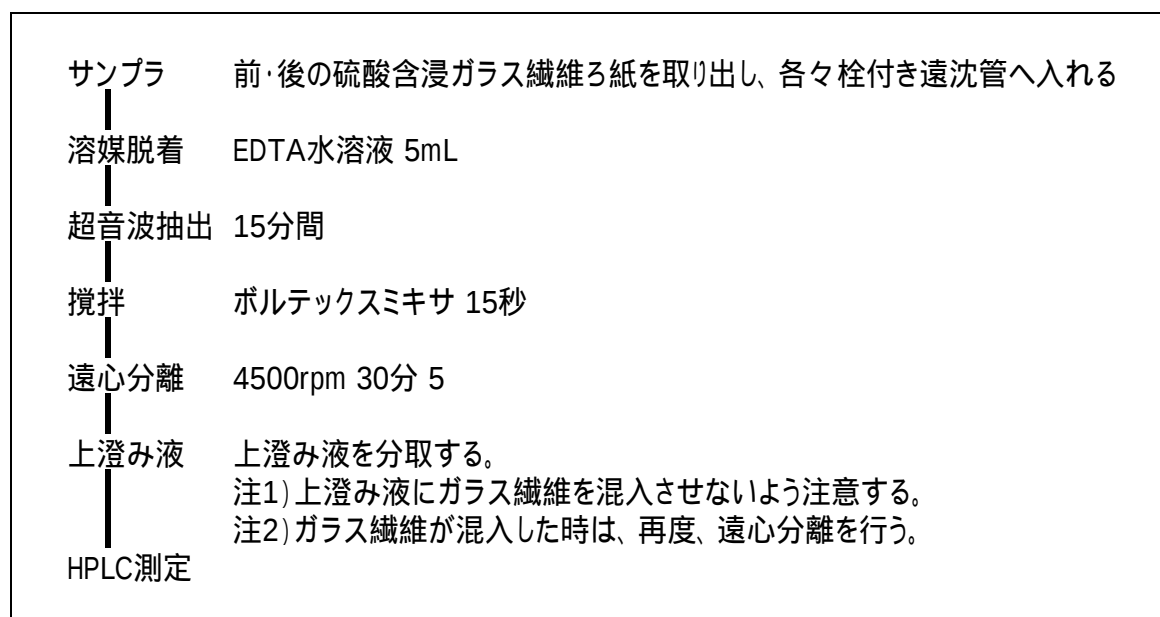


図 4. 溶媒脱着方法フロー

6. 分析結果

6-1. 検量線の直線性確認

o-PD 標準溶液 0-200 $\mu\text{g/mL}$ 範囲を測定し、検量線の直線性を確認した。表 4 にピーク面積値、図 5 には検量線、図 6 にクロマトグラム重ね書きを示す。検量線は 0-1 $\mu\text{g/mL}$ 範囲で相関係数 (R^2) 0.9998、0-200 $\mu\text{g/mL}$ では相関係数 (R^2) 1.0000 であった。

表 4. ピーク面積値

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	面積値
0.000	0
0.005	610
0.010	1164
0.050	6066
0.100	11210
0.500	62695
1.000	123592
5.000	673031
10.000	1346173
50.000	6727736
100.000	13343981
200.000	26383202

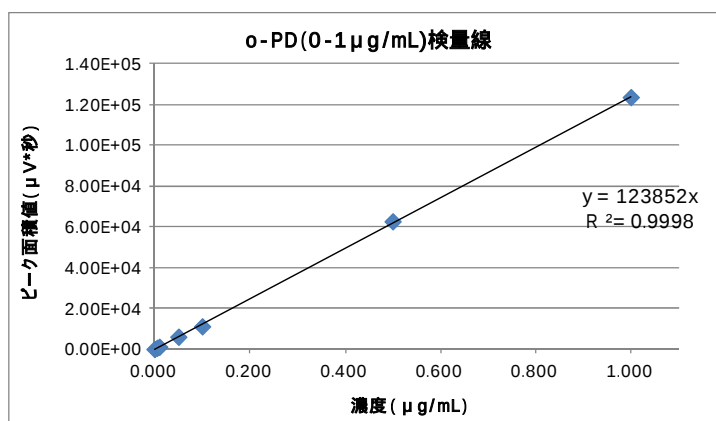


図 5-1. 検量線 (0~1 $\mu\text{g/mL}$)

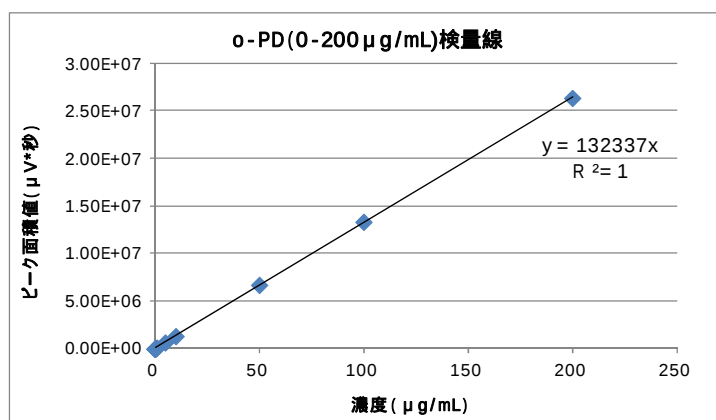


図 5-2. 検量線 (0~200 $\mu\text{g/mL}$)

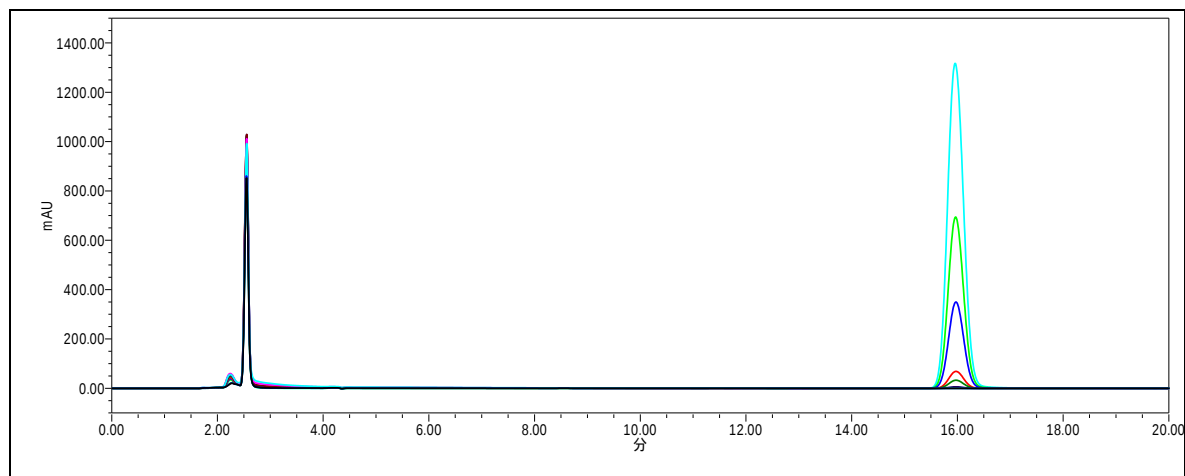


図 6. o-PD 標準溶液のクロマトグラム (0~200 $\mu\text{g/mL}$)

6-2．検出下限値および定量下限値の確認

許容濃度の 1/200 に相当する o-PD 標準溶液 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (1L/min で 4 時間捕集、最終液量 5mL の場合の気中濃度は 0.0005 mg/m^3) を 5 検体繰り返し測定し、検出下限および定量下限値を求めた。検出下限は面積値より算出した濃度の標準偏差の 3 倍、定量下限値は標準偏差の 10 倍として算出した (表 5)。変動係数は 3.325%、検出下限値 (3σ) は 0.0010 $\mu\text{g/mL}$ 、定量下限値 (10σ) は 0.0033 $\mu\text{g/mL}$ であった。

表 5．検出下限値および定量下限値

	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)	検出下限値(3σ) ($\mu\text{g/mL}$)	定量下限値(10σ) ($\mu\text{g/mL}$)
繰り返し分析 1 回目	0.0101	0.0098	0.00033	3.3247	0.0010	0.0033
繰り返し分析 2 回目	0.0095					
繰り返し分析 3 回目	0.0102					
繰り返し分析 4 回目	0.0096					
繰り返し分析 5 回目	0.0096					

6-3．気中濃度定量下限値

表 5 の定量下限値より、気中濃度定量下限値を算出した (表 6)。捕集量 240L (1L/min、4 時間) の場合、気中濃度定量下限値は 0.00007 mg/m^3 であった。

表 6．気中濃度定量下限値

捕集量 (L)	通気流量 (L/min)	捕集時間 (min)	最終液量 (mL)	o-PD 定量下限値 ($\mu\text{g/mL}$)	気中濃度 定量下限値 (mg/m^3)
10	1.0	10	5	0.0033	0.001633
20		20			0.000816
60		60			0.000272
120		120			0.000136
240		240			0.000068
480		480			0.000034

6-4．ブランク確認

硫酸含浸ガラス繊維ろ紙 1 枚に 0.1g/L EDTA 水溶液を 5mL 添加し、溶媒脱着後の上澄み液を HPLC にて測定しブランクを確認した。ブランク溶液からは、o-PD の保持時間に重なる夾雑成分の溶出は見られなかった。

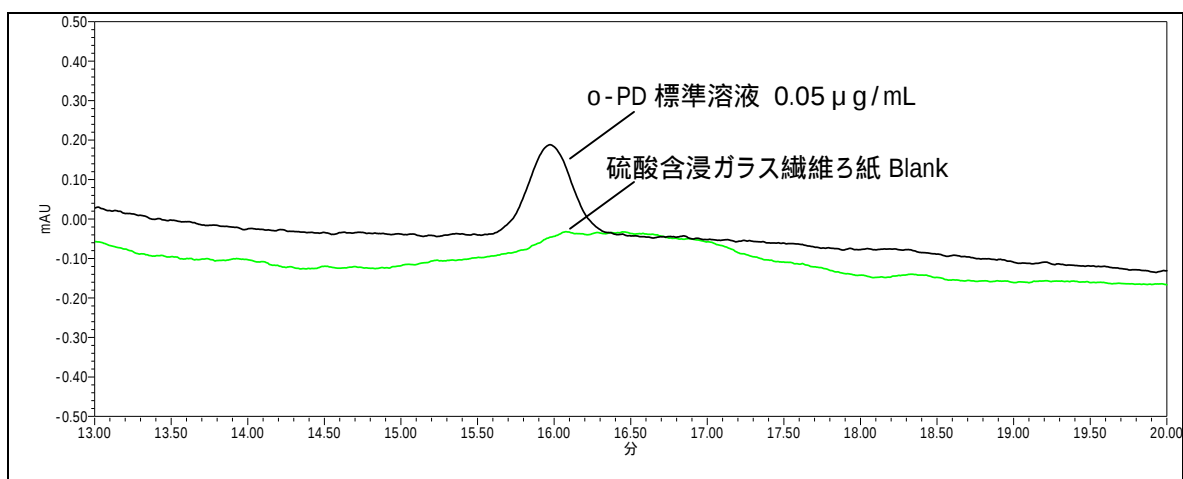


図 7．サンプル空白溶液のクロマトグラム（保持時間確認：o-PD 標準溶液 0.05 µg/mL）

6-5．破過

サンプル 1 層目の硫酸含浸ガラス繊維ろ紙に、許容濃度の 2E に相当する o-PD 標準溶液 48.72 µg を添加した。その後、室内空気を 1L/min で 4 時間吸引、溶媒脱着の後、HPLC で測定し 2 層目への破過を確認した。表 7 に破過確認の結果を示す。2 層目へは 0.04% 程度の破過が生じた。また、1 層目の平均回収率は 77.7% であるが、変動係数が 24.9%（回収率 44.2-88.8%）と大きかった。

表 7．破過確認結果

気中濃度	添加量 (µg)	サンプル数	1 層目		2 層目	
			回収率	変動係数	回収率	変動係数
			(%)	(C.V.%)	(%)	(C.V.%)
2E	48.72	(n=5)	77.68	24.87	0.04	91.29

6-6．脱着率

脱着率は、サンプル 1 層目の硫酸含浸ガラス繊維ろ紙に許容濃度の 1/1000E、1/50E、2E に相当する o-PD 標準溶液を添加し各濃度 5 検体作製した。その後、サンプルをキャップで密栓し、4 で 24 時間保存し、溶媒脱着、HPLC で測定した。2E の平均回収率は 78.9%（変動係数 14.0%）であり、1/50E、1/1000E と濃度が低くなるにつれ添加濃度と乖離する結果となった。

6-7．添加回収試験

添加回収率は、サンプル 1 層目の硫酸含浸ガラス繊維ろ紙に許容濃度の 1/1000E、1/50E、2E に相当する o-PD 標準溶液を添加し各濃度 5 検体作製した。その後、室内空気を 1L/min で 4 時間吸引、溶媒脱着の後、HPLC で測定した。2E の平均回収率は 77.7%（変動係数 24.9%）であり、1/50E、1/1000E と濃度が低くなるにつれ添加濃度と乖離する結果となった。

6-8. 保存性試験

保存性は、サンブラ 1 層目の硫酸含浸ガラス繊維ろ紙に許容濃度の 1/1000E、1/50E、2E に相当する o-PD 標準溶液を添加した。その後、室内空気を 1L/min で 4 時間吸引し、サンブラをキャップで密栓し、4 で保存した。サンプル作製直後を基準値の 0 日目 (n=5) として、1 (n=3)、3 (n=3)、5 (n=3)、7 (n=5) 日後に溶媒脱着を行い HPLC で測定した。2E 相当の 1 日目、7 日目は平均回収率が 90% であったが、その他の濃度、および各保存日数では添加濃度と乖離する結果となった。

7. まとめ

本検討の結果、破過、脱着率、添加回収率、保存性試験において添加濃度に比してばらついた結果となった。そのため分析条件については、許容濃度 (0.1mg/m³) の 1/1000 ~ 2 倍相当の濃度範囲を分析できる手法ではあるがサンプリング時の安定性について再度確認する必要があると考えられた。これらの要因として、硫酸含浸ガラス繊維ろ紙に添加した o-PD は、室内空気を 240L 通気後、添加部位が黄色または薄茶色に変色していたことから、通気により一部においては酸化が促進し分解していた事も推測される。今後、引き続き今回の結果を精査し、o-PD を安定に捕集できる分析方法を検討する必要があると思われる。

8. 検討機関

株式会社 日立ハイテクサイエンス

参考文献

1) 製品安全データシート (オルト-フェニレンジアミン) 職場の安全サイト、厚生労働省 (2010 年更新)

<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/95-54-5.html>

2) ACGIH 2009、日本産業衛生学会 2009

(別紙)

o-フェニレンジアミン標準測定分析法

化学式： $C_6H_8N_2$

CAS No： 95-54-5

許容濃度等：

A C G I H TLV - TWA： $0.1mg/m^3$

O S H A TLV-TWA： —

日本産業衛生学会： $0.1mg/m^3$

物性等

分子量：108.14 沸点()：256-258

融点：103-104 蒸気圧：1.3Pa (20)

形状：個体 密度： $1.14g/cm^3$ (20)

別名 o-ジアミノベンゼン、1,2-ベンゼンジアミン

サンプリング	分 析
<u>サンブラー</u> ：硫酸含浸ガラス繊維ろ紙(2 層) (株)ガステック製)	<u>分析方法</u> ：高速液体クロマトグラフ法
<u>サンプリング流量</u> ：1.0L/min	<u>脱着方法</u> ：EDTA 水溶液 5mL(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.13g を純水で秤量し 1000mL に定容。)
<u>サンプリング時間</u> ：4 時間 (240L)	<u>希釈溶液</u> ：0.1%硫酸含有 EDTA 溶液(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.13g を約 800mL の純水で溶解する。そこへ 98%硫酸を 1020 μL 添加し 1000mL に定容。)
<u>採気量</u> ：240L	<u>標準原液</u> ：o-フェニレンジアミンを 20mg 秤量し希釈溶液で溶解し 10mL に定容する。この標準原液中の o-フェニレンジアミン濃度は 2000 μg/mL である。
<u>保存性</u> ： ----	<u>標準溶液</u> ：標準溶液を希釈溶液で適宜希釈し調製する。
<u>ブランク</u> ：分析時はブランクが必要。	<u>測定条件</u>
精 度	機器：日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
<u>脱着率</u> ：	カラム：LaChrom C18(4.6mmI.D. , × 250mmL , 5 μm) (機器,カラム(株)日立ハイテクサイエンス製)
添加量 0.02436 μg の場合 ----%	カラム温度：35
0.4872 μg の場合 ----%	移動相：50mmol/L Na ₂ HPO ₄ (pH7.0)/CH ₃ CN=95/5
48.72 μg の場合 ----%	(50mmol/L Na ₂ HPO ₄ 緩衝液：リン酸水素二ナトリウム(無水)を 7.10g 秤量し、約 950mL の純水で溶解。pH を確認しながら 85%リン酸を少しずつ添加し pH7 に調製)
<u>回収率</u> ：(4 時間通気)	流速：1.0mL/min 検出器：UV 240nm
添加量 0.02436 μg の場合 ----%	試料注入量：50 μL
0.4872 μg の場合 ----%	<u>検量線</u> ：0.005-200 μg/mL の範囲で直線性(R ² =1.0000)が得られた。
48.72 μg の場合 ----%	<u>定量法</u> ：絶対検量線法
検出下限 (3 σ) 0.0010 μg/mL(最終試料液濃度)	
定量下限 (10 σ) 0.0033 μg/mL(最終試料液濃度)	
採気量 10 ℓ 0.001633mg/m ³	
採気量 240 ℓ 0.000068mg/m ³	

適用

平成26年2月27日

