

パラ-フェニルアゾアニリンの測定手法検討結果

平成24年3月9日

測定手法検討分科会

目 次

1. はじめに

2. 予備試験

2-1. パラ-フェニルアゾアニリン (4-アミノアゾベンゼン, AAB) および 2-メチル-4-(2-トリルアゾ)アニリン (o-アミノアゾトルエン, AAT) の測定法に関する文献調査

2-2. 捕集方法の検討

2-2-1. サンプリング・デザインの決定

2-2-2. サンプラーの決定

2-3. 分析方法の検討

2-3-1. 抽出溶液の決定

2-3-2. HPLC 分析条件

2-3-3. 測定波長

3. 本試験

3-1. 捕集及び分析条件

3-2. 添加回収率

3-3. 捕集後のサンプラーの保存安定性

3-4. 検量線 (直線性)

3-5. 検出下限及び定量下限

3-6. まとめ

4. 検討担当機関

中央労働災害防止協会 大阪労働衛生総合センター

5. 参考文献

1. はじめに

物性情報等と構造式を下記に示した¹⁻⁴⁾ (表1, 図1)。

表1 パラ-フェニルアゾアニリン (4-アミノアゾベンゼン, AAB) および 2-メチル-4-(2-トリルアゾ)アニリン (o-アミノアゾトルエン, AAT) の物性情報等

	AAB	AAT
用途	塩として染色, アシッドイエロー, ジアゾ染料の合成中間体, 二塩基酸の評価試薬(比色分析)	靴墨及びその他のワックスつや出し剤の着色
別名	4-アミノアゾベンゼン C.I. Solvent Yellow 1	o-アミノアゾトルエン C.I. Solvent Yellow 3
分子式(分子量)	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ (197.24)	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ (225.29)
CAS番号	60-09-3	97-56-3
形状	固体(オレンジ色)	固体(赤褐色～オレンジ色)
沸点	>360℃	データなし
溶解度	32.0 mg/L (25℃) エタノール, 酸, ジエチルエーテル	7.00 mg/L (25℃), 7.64 mg/L (25℃) アルコール, エーテル, クロロホルム
オクタノール・水分配係数	Log Pow = 3.41	Log Pow = 4.92, Log Pow = 3.92
pKa*	2.85	2.90
許容濃度	産衛(未設定), ACGIH(未設定)	産衛(未設定), ACGIH(未設定)
発がん性	産衛(2B), IARC(2B)	産衛(2B), IARC(2B)

*化学構造－物性計算ウェブサイト (SPARC : SPARC Performs Automated Reasoning in Chemistry) を用いた推定値

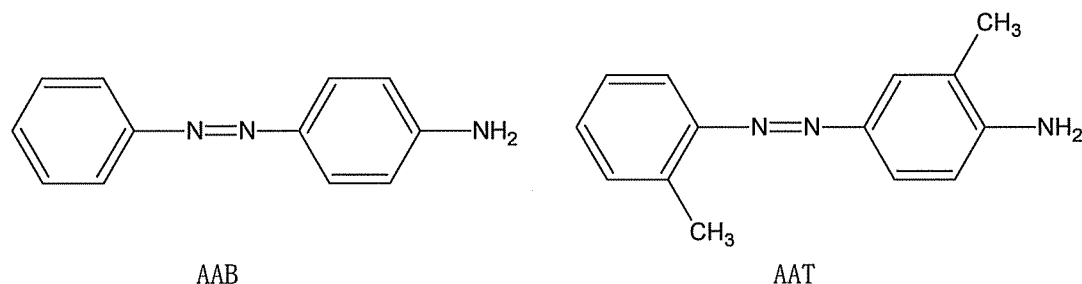


図1 AAB および AAT の構造式

2. 予備試験

2-1. パラ-フェニルアゾアニリン (4-アミノアゾベンゼン, AAB) および 2-メチル-4-(2-トリルアゾ)アニリン (o-アミノアゾトルエン, AAT) の測定法に関する文献調査

現在のところ、国内外において空气中(作業環境中および大気中) AAB および AAT の測定方法は報告されていない。

2-2. 捕集方法の検討

2-2-1. サンプリング・デザインの決定

AAB および AAT は、常温・大気圧下で固体であるため、ろ過捕集を採用することとした。また、現在のところ許容濃度が設定されていないため、今回は暫定目標下限濃度として 1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)を設定した。以上のことから、サンプリング・デザインを下記の通り決定した。

測定範囲：1-2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

フィルターに捕集される AAB および AAT は、0.250-500 μg と設定される。

サンプリング流量および時間：1 l/min, 最大 4 時間

採気量：最大 240 l

2-2-2. サンプラーの決定

サンプラーを決定するために、次の 3 タイプ（計 4 種類）のフィルターについて、暫定目標下限濃度（1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で添加回収試験を行った。

- ① ガラスファイバーフィルター (GB-100R)
- ② 硫酸含浸ガラスファイバーフィルター (303)
- ③ ディスク型固相 (Empore Disk C18)
- ③ ディスク型固相 (ENVI-Disk C18)

試験条件を下記に示した（表 2）。また分析条件は、ISO の方法（17234-1, 17234-2）を参考に下記の通りとした^{5,6)}（表 3）。なお、硫酸含浸フィルターの試験条件は、下記の理由により決定した。

（標準溶液の溶媒）

硫酸含浸フィルターに標準溶液を添加する場合、その標準溶液中で AAB はイオン状態（解離状態）でなければならない。したがって、AAB と AAT の pKa（AAB: 2.85, AAT: 2.90）から標準溶液の pH を (pKa-2) 以下とするために、硫酸濃度を 0.125 M (0.25 N) とした。

（抽出溶液）

AAB と AAT の pKa から、抽出効率を向上させるために、抽出後の溶液の pH を (pKa+2) 以上とした。すなわち、抽出後の溶液の pH が 7 付近を示すように、抽出溶液のアルカリ濃度を設定した (0.05 M)。なお、アルカリは NaOH を採用した。また AAB と AAT は水に溶けにくいので、緩衝液を用いることは避け、所定量の NaOH を溶解できるメタノールを抽出溶液の溶媒として採用した。しかしながら、最終的な抽出溶液の決定は、サンプラーが決定した後、再度検討を行うこととした。

表 2 試験条件

添加量	0.250 μg		
通気量	240 l		
抽出液量	5 ml		
	標準溶液の溶媒	抽出溶液	抽出操作
ガラスファイバー	メタノール		5 min振とう→遠心 (3000 rpm, 10 min)
硫酸含浸	0.125 M (0.25 N) H_2SO_4 in メタノール	0.05 M NaOH in メタノール	
固相	メタノール		10 min超音波→遠心 (3000 rpm, 10min)

表 3 分析条件

装置	Prominence UFLC(島津製作所社製)
カラム	InertSustain C18(5 μm , 150 $\times$ 4.6 mm)
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	A: 5 mM リン酸二水素アンモニウム+5 mMリン酸二ナトリウム B: アセトニトリル (アイソクラティック, A/B = 30/70, 1.0 ml/min)
検出器	フォトダイオードアレイ検出器(PDA) (検出波長: 190–600 nm, 定量波長: 385 nm)
注入量	10 μl

結果として、暫定目標下限濃度では、どのフィルターも 80%以上の回収率は得られなかった(表 4)。最も良い結果を示したのは、硫酸含浸フィルターであったため、追加試験として暫定目標下限濃度 $\times$ 10 および $\times$ 2000 において、添加回収試験を行った。AAB および AAT ともに、80%以上の回収率が得られたため、硫酸含浸フィルターをサンプラーとして採用することとした(表 5)。

これらの結果から、暫定目標下限濃度をクリア出来る可能性は低いと推察されるが、暫定目標下限濃度の 10 倍 (10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) はクリアできる可能性はあると思われた。

表 4 4 種類のフィルターの添加回収率

	回収率(%)	
	AAB	AAT
ガラスファイバー	0	0
硫酸含浸	60	77
固相(Empore Disk C18)	44	0
固相(ENVI-Disk C18)	0	0

n = 2 (硫酸含浸 n = 3)

表 5 硫酸含浸フィルターの添加回収率

添加量(μg)	回収率(%) (Mean±SD(RSD))	
	AAB	AAT
2.50	81±3.5 (4.3)	94±3.2(3.4)
500	104±2.1(2.0)	103±1.2(1.1)

n = 3

2-3. 分析方法の検討

2-3-1. 抽出溶液の決定

抽出溶液を決定するために、次の 3 種類の抽出溶液について、抽出率試験を行い、抽出溶液を決定した。試験条件を下記に示した(表 6)。分析条件は 2-2-2 で用いた条件と同様である(表 3)。

表 6 試験条件

サンプラー	硫酸含浸ガラスファイバーフィルター303(ガステック社製)
添加量	2.50 μgおよび500 μg (0.125 M (0.25 N) H ₂ SO ₄ in メタノール標準液を25 μl添加)
通気量	10 l (1 l/min × 10 min)
抽出液量	5 ml
前処理	5 min 振とう→遠心(3000 rpm, 10 min)

どちらの添加量においても、各抽出溶液において抽出率の差はなかった(表 7)。したがって、抽出溶液はメタノールを採用することとした。

表 7 3 種類の抽出溶液の抽出率

添加量: 2.50 (μg)	抽出率(%)	
	AAB	AAT
メタノール	95	96
0.125 M (0.25 N) H ₂ SO ₄ in メタノール	97	98
0.05 M NaOH in メタノール	97	99

添加量: 500 (μg)	抽出率(%)	
	AAB	AAT
メタノール	100	99
0.125 M (0.25 N) H ₂ SO ₄ in メタノール	102	102
0.05 M NaOH in メタノール	103	102

n = 3

2-3-2. HPLC 分析条件

AAB および AAT の分析方法については、下記が参考となると考えられた⁵⁻⁷⁾ (表 8)。実際の作業場では、他の色素も多く使用されていると考えられるため、可能な範囲で分離条件を検討しておく必要がある。ISO の方法は基本的に芳香族アミンをターゲットとした方法であるため、16 種類の色素をターゲットとしている BS の方法を採用することとした (表 9)。

しかしながら、BS の HPLC-PDA の方法は 3 液混合 (主流は 2 液混合) のグラジエント分析であり、ランタイムが 45 分もかかる。また HPLC-MS も、2 液混合のグラジエント分析ではあるものの、32 分のランタイムがかかる。今回は 16 種類を全て分離する必要はなく、AAB と AAT が他色素と分離していればよいので、HPLC-PDA の分析条件をベースとして、通常分析における最適な条件を検討した。更に、本ばく露調査は処理検体数が多くなるため、高速分析条件も検討した。分析条件を下記に示した (表 10)。

表 8 AAB および AAT の分析に関する文献

ISO 17234-1	Leather-Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers- Part 1: Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants	HPLC-PDA GC-MS CE TLC
ISO 17234-2	Leather-Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers- Part 2: Determination of 4-aminoazobenzene	
BS EN 71-11: 2005	Safety of Toys- Part 11: Organic chemical compounds-Method of analysis	HPLC-PDA HPLC-MS

表 9 BS EN71 で規制されている 16 種の色素

Name	CAS No.	今回購入したメーカー
C.I. Disperse Blue 1	2475-45-8	アルドリッチ
C.I. Disperse Blue 3	2475-46-9	アルドリッチ
C.I. Disperse Blue 106	12223-01-7	Fluka
C.I. Disperse Blue 124	61951-51-7	Fluka
C.I. Disperse Yellow 3	2832-40-8	アルドリッチ
C.I. Disperse Orange 3	730-40-5	アルドリッチ
C.I. Disperse Orange 37	13301-61-6	Fulka
C.I. Disperse Red 1	2872-52-8	東京化成
C.I. Solvent Yellow 1	60-09-3	東京化成
C.I. Solvent Yellow 2	60-11-7	東京化成
C.I. Solvent Yellow 3	97-56-3	東京化成
C.I. Basic Red 9	569-61-9	東京化成
C.I. Basic Violet 1	8004-87-3	東京化成
C.I. Basic Violet 3	548-62-9	東京化成
C.I. Acid Red 26	3761-53-3	東京化成
C.I. Acid Violet 49	1694-09-3	東京化成

表 1 0 HPLC 分析条件

サンプル	色素(16種)混合標準溶液(50 µg/ml in メタノール) 各色素標準溶液(50 µg/ml in メタノール)					
装置	Prominence UFLC(島津製作所社製)					
検出器	フォトダイオードアレイ検出器(PDA) (検出波長:240-800 nm, 定量波長:385 nm)					
移動相	A:0.1% ギ酸+10 mmol/l 酢酸アンモニウム, B:アセトニトリル					
カラム流量	1.0 ml/min					
カラム温度	40°C					
	通常分析			高速分析		
カラム	InertSustain C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm)			InertSustain C18 HP (3 µm, 100 x 3.0 mm)		
グラジエント条件	Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	80	20	0.00	80	20
	25.00	10	90	5.50	10	90
	30.00	10	90	7.00	10	90
	30.01	80	20	7.01	80	20
	40.00	80	20	10.00	80	20
注入量	10 µl			4 µl		

通常分析条件において、AAB は他成分と分離した。一方、AAT は Max Plot 上では、Disperse Blue 124 のピークと重なったが、測定波長 385 nm では Disperse Blue 124 はほとんど検出されないため、共存した場合においても、著しい妨害はないと考えた（図 2）。

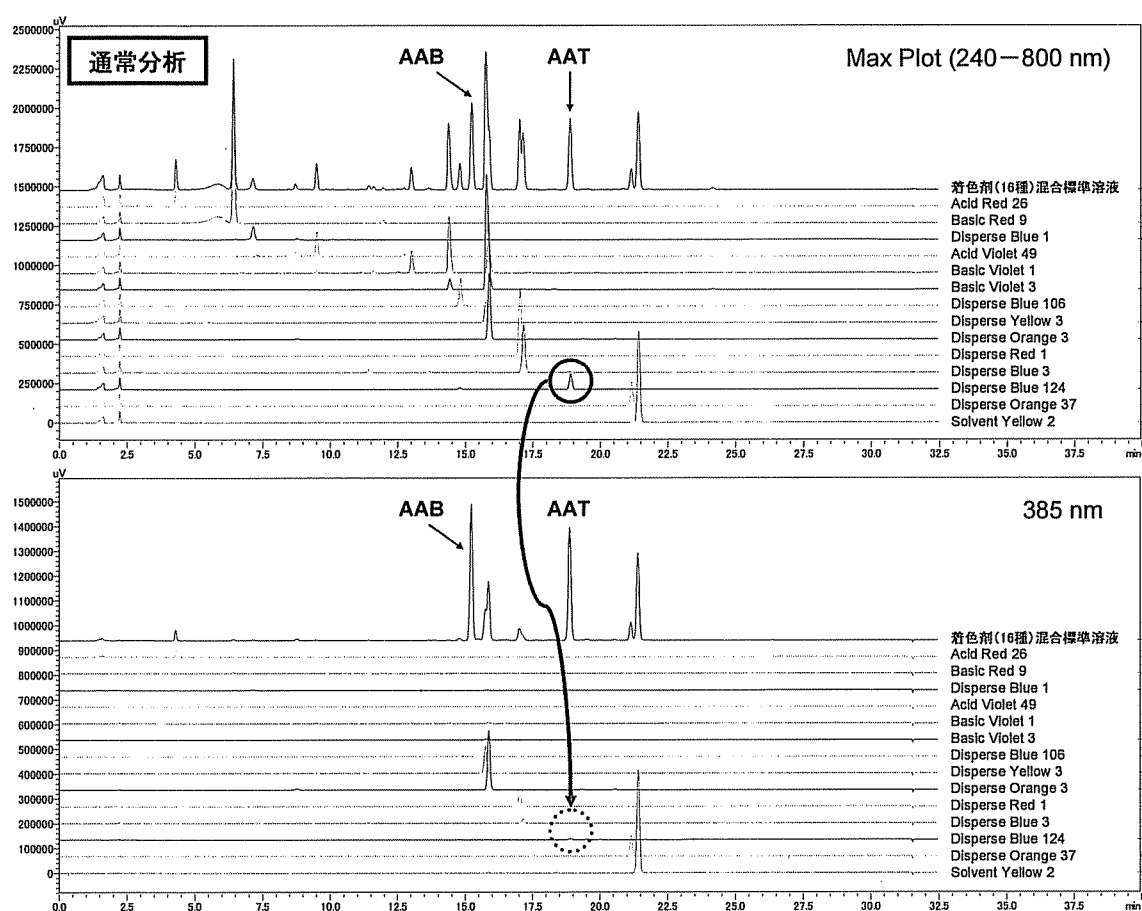


図 2 通常分析でのクロマトグラム

高速分析用カラムを用いることにより、通常分析の分離パターンを維持したまま、1/4 の時間で分析が可能となった（図 3—5）。以上のことから、高速分析条件を採用することとした。

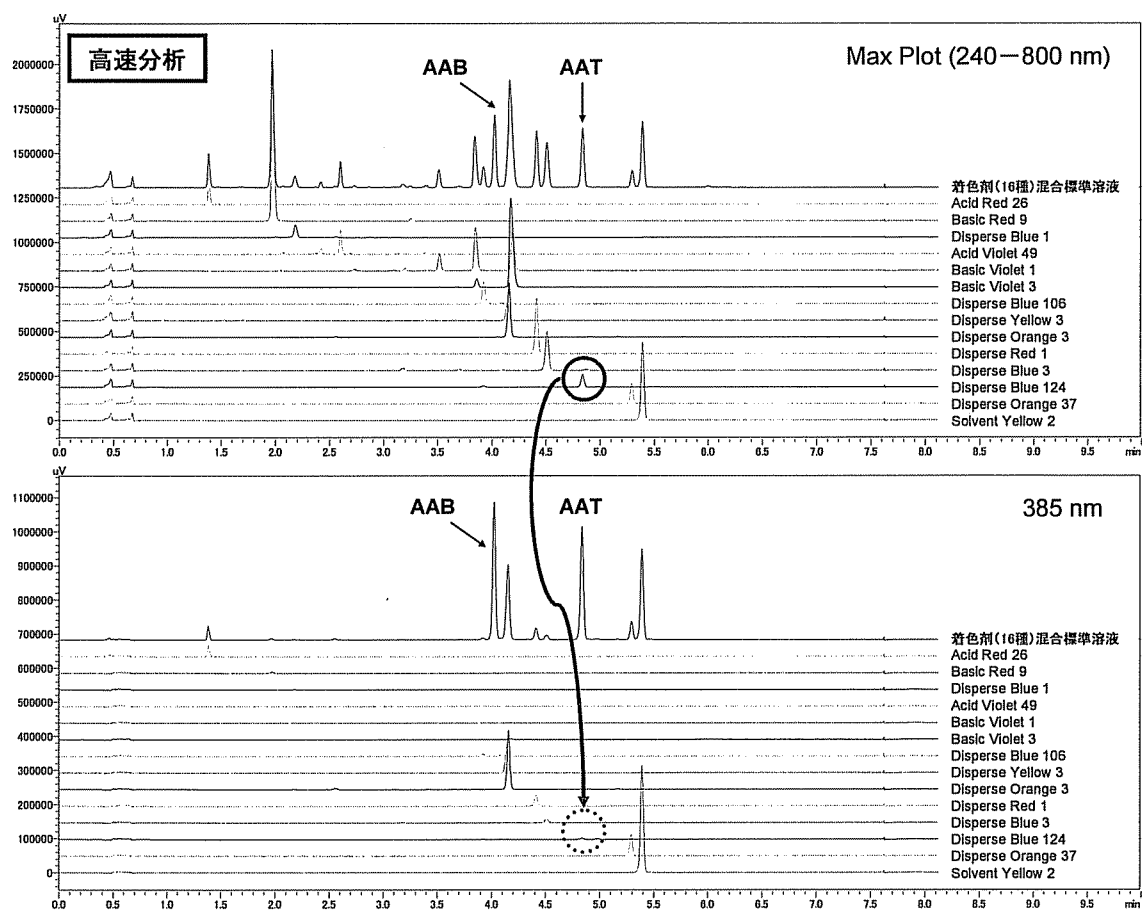


図3 高速分析でのクロマトグラム

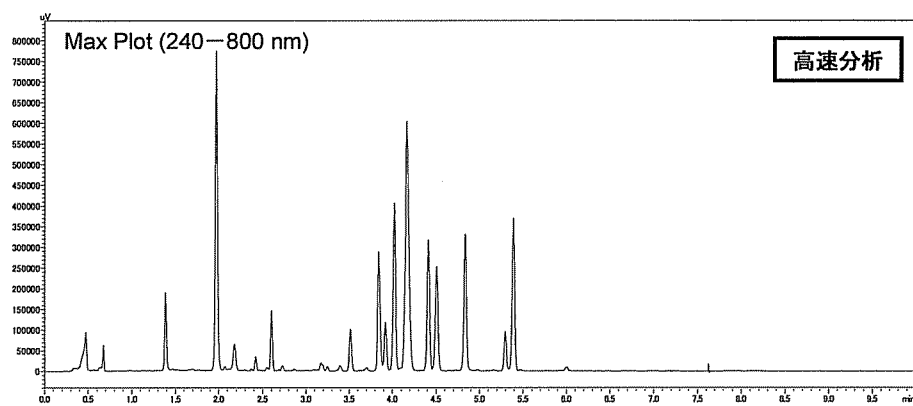
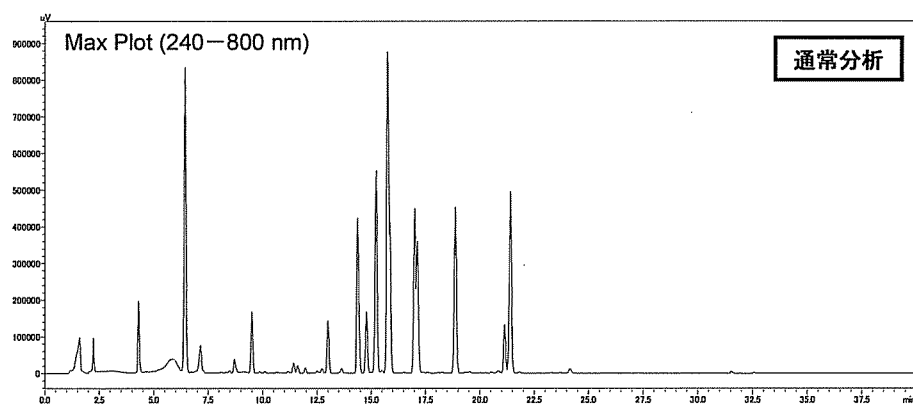


図4 通常分析と高速分析でのクロマトグラムの比較 (Max Plot)

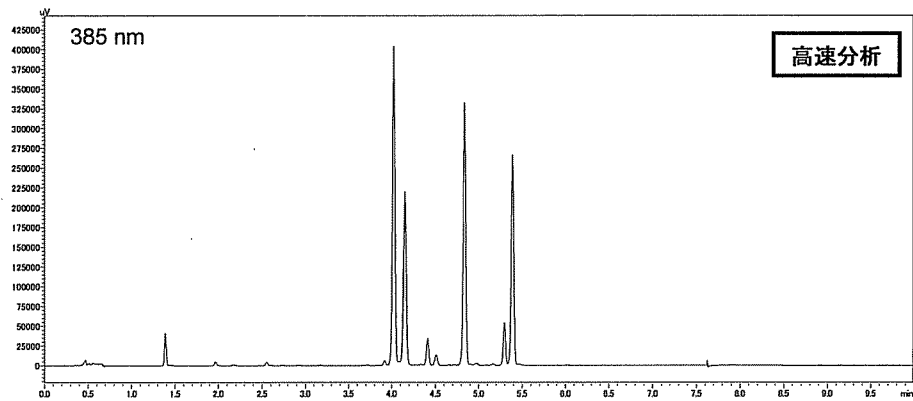
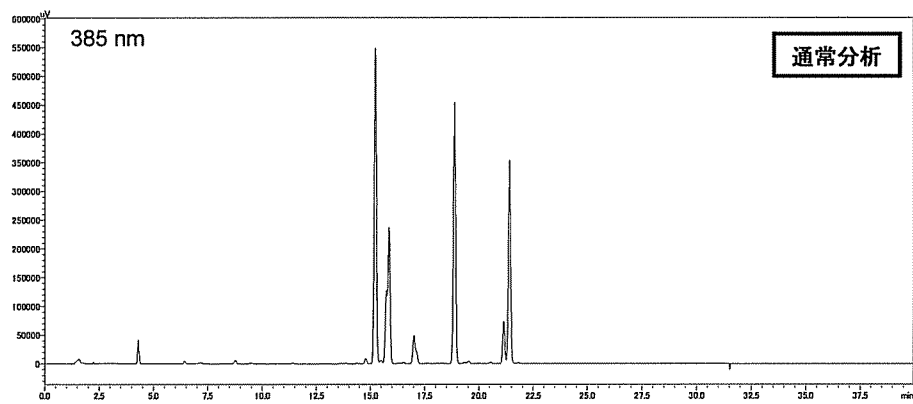


図5 通常分析と高速分析でのクロマトグラムの比較 (385 nm)

2-3-3. 測定波長

測定波長を決定するために、240—800 nm の吸収スペクトルを測定した結果、極大吸収波長は、385 nm 付近であった（図6）。したがって、定量波長は、385 nm に決定した。

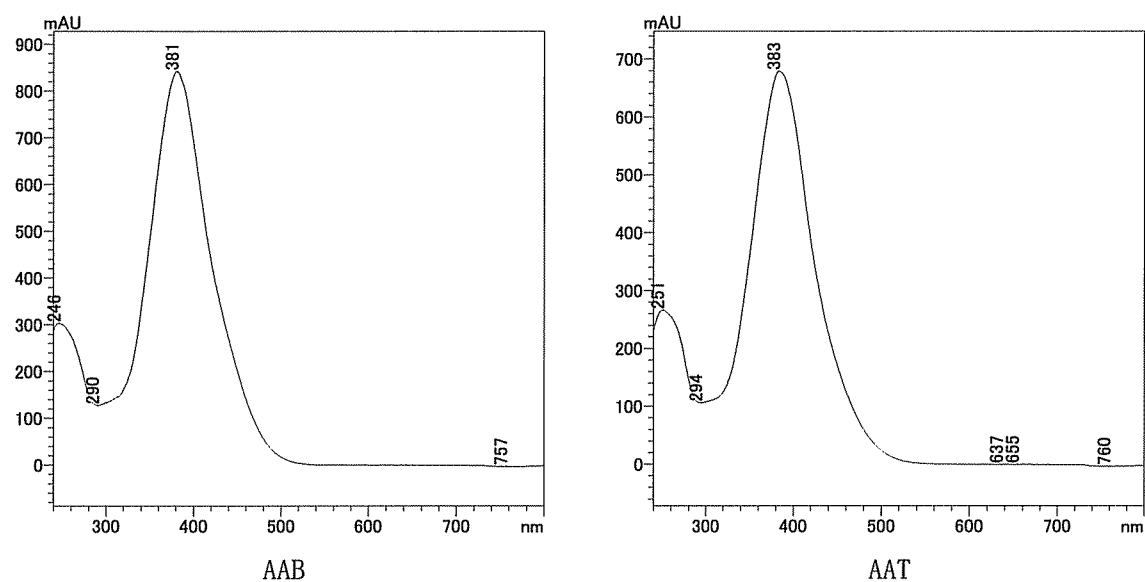


図6 AAB および AAT の吸収スペクトル

3. 本試験

3-1. 捕集及び分析条件

予備検討の結果から決定した、捕集および分析条件を示した（表 1 1）。

表 1 1 捕集および分析条件

捕集条件			
サンプラー	硫酸含浸ガラスファイバーフィルター（No. 303, ガステック社製）をフィルターカセット（No. 225-3LF, SKC社製）に2枚セットする		
捕集流量および時間	1 l/min, 4時間		
HPLC分析条件			
装置	Prominence UFLC（島津製作所社製）		
検出器	フォトダイオードアレイ検出器(PDA) （検出波長：240－800 nm, 定量波長：385 nm）		
移動相	A:0.1% ギ酸＋10 mmol/l 酢酸アンモニウム, B:アセトニトリル		
カラム流量	1.0 ml/min		
カラム温度	40℃		
カラム	InertSustain C18 HP (3 μm, 100 x 3.0 mm)		
グラジエント条件	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	80	20
	5.50	10	90
	7.00	10	90
	7.01	80	20
	10.00	80	20
注入量	4 μl		
前処理			
抽出液	メタノール(5 ml)		
抽出操作	振とう(5 min)→遠心(3000 rpm, 10 min)		

3-2. 添加回収率

硫酸含浸フィルターに AAB 標準液 (0.125 M H₂SO₄ in メタノール : 50–20000 µg/ml) を添加 (25 µl) し、室内空気 (20.6–26.0°C, 22–32%) を流速 1.0 l/min で 4 時間吸引した後、抽出及び分析を行った。5.00 µg 以上の添加量において、添加回収率は 82–98% と良好であった (表 1 2)。また、2.50 µg 添加時の回収率が 80% 以下であったため、本法の定量下限値を 5.00 µg/sample とした。硫酸含浸フィルターに AAB (25.0 µg) を添加したサンプルのクロマトグラムを以下に示した (図 7)。なお全てのサンプルで、バックアップ・フィルターからは AAB は検出されなかった。

表 1 2 添加回収率

添加量 (µg)	AAB			
	回収率 (%)		RSD (%)	
	Mean	SD		
1.25	52 ± 2.3	4.4		
2.50	77 ± 1.4	1.8		
5.00	82 ± 0.5	0.6		
12.5	88 ± 1.0	1.2		
25.0	97 ± 0.7	0.7		
250	96 ± 0.5	0.6		
500	98 ± 0.6	0.6		

n = 5

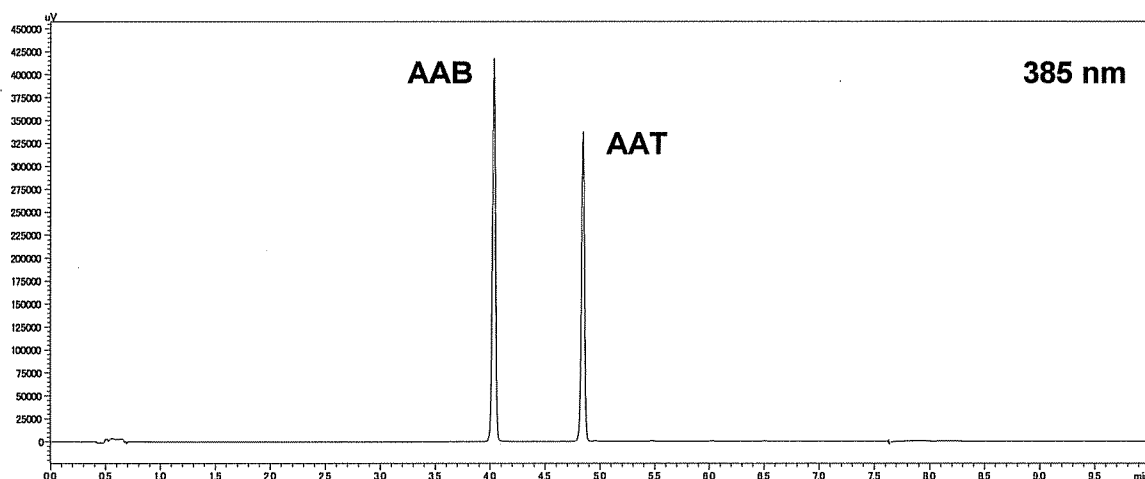


図 7 硫酸含浸フィルターに AAB (25.0 µg) を添加したサンプルのクロマトグラム

3-3. 捕集後のサンプラーの保存安定性

硫酸含浸フィルターに、AAB 標準液 (0.125 M H₂SO₄ in メタノール:200, 1000 および 10000 µg/ml) を添加 (25 µl) し、室内空気 (18.8–23.1°C, 23–34%) を流速 1.0 l/min で 4 時間吸引した後、速やかに両端にキャップをし、冷蔵保存した。そして、捕集直後を基準として、1, 3, 5 日目の保存安定性を確認した。その結果、全ての添加量において少なくとも 5 日目まで保存可能であることが確認された (表 1 3)。

表 1 3 保存安定性

添加量 (μg)	保存日数	AAB			
		回収率 (%)			RSD (%)
		Mean	SD		
5.00	0	100	±	0.1	0.1
	1	100	±	0.3	0.3
	3	98	±	1.4	1.4
	5	96	±	2.0	2.1
25.0	0	100	±	0.8	0.8
	1	99	±	0.2	0.2
	3	98	±	0.3	0.3
	5	99	±	0.5	0.5
250	0	100	±	0.7	0.7
	1	100	±	0.7	0.7
	3	101	±	0.5	0.5
	5	101	±	0.8	0.8
n = 3					

3-4. 検量線（直線性）

AAB 標準原液（メタノール溶液）をメタノールで希釈し、0.0500—100 µg/ml の範囲で標準系列を調製し、検量線の直線性について確認を行った。その結果、実験の範囲で直線性を示した（図 8，表 1 4）。

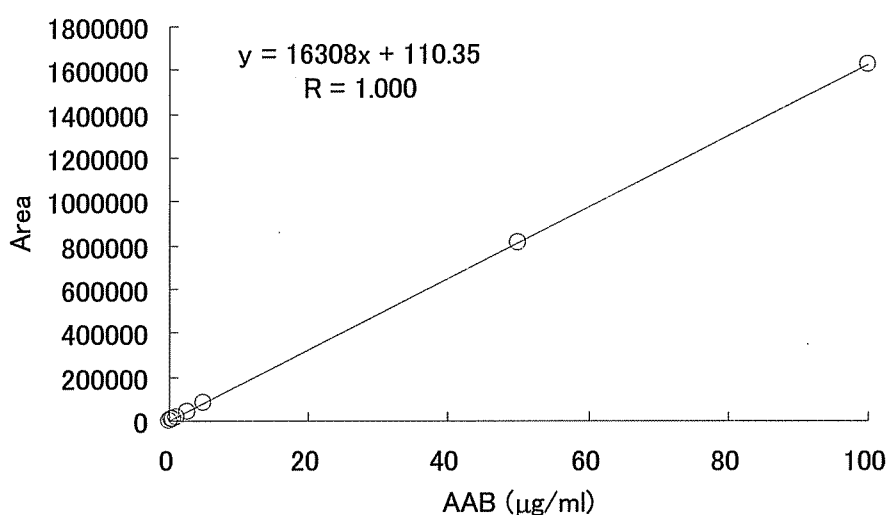


図 8 検量線

3-5. 検出下限及び定量下限

検量線として調製した AAB 標準液の最低濃度（0.0500 µg/ml）を 5 サンプル分析し、ピーク面積値の標準偏差（SD）を算出した。得られた標準偏差から検量線を用い、次式より分析装置の検出下限（LOD）及び定量下限（LOQ）を求めた（表 1 4）。

$$\text{LOD } (\mu\text{g/sample}) = (3 \text{ SD}/a) \times b \quad \text{LOQ } (\mu\text{g/sample}) = (10 \text{ SD}/a) \times b$$

(a : 検量線の傾き, b : 抽出溶液量 (5 ml))

また、添加回収試験の結果から、本法の定量下限は 5.00 µg/sample であったため、個人ばく露測定（240 l 採気）の定量下限値は、21 µg/m³ となった（表 1 4）。

表 1 4 検出・定量下限

検量線	直線範囲 (µg/ml)	0.0500—100
	相関係数	1.000
装置	LOD (µg/sample)	0.0497
	LOQ (µg/sample)	0.166
測定法のLOQ	捕集量 (µg/sample)	5.00
	240 l 採取時の気中濃度 (µg/m ³)	21

3－6．まとめ

本法は、個人ばく露測定法（4 時間サンプリング）として、21－2083 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲を測定することが可能である。

4．検討担当機関

中央労働災害防止協会 大阪労働衛生総合センター

5. 参考文献

- 1) 安全衛生情報センター. 製品安全データシート (パラ-フェニルアゾアニリン) . 2011
- 2) 安全衛生情報センター. 製品安全データシート (2-メチル-4- (2-トリルアゾ) アニリン) . 2006
- 3) International Agency for Research on Cancer (IARC). para-Aminoazobenzene, ortho-Aminoazotoluene. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs volumes 1 to 42, Supplement 7. Lyon (France): IARC; 1987. p. 56.
- 4) Japan Society for Occupational Health. Recommendation of occupational exposure limits (2011-2012). J Occup Health 2011; 53: 395–411.
- 5) International Organization for Standardization (ISO). Leather – Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers –, Part 1: Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants (ISO 17234-1, IULTCS/IUC 20-1). Geneva (Switzerland): ISO; 2010.
- 6) International Organization for Standardization (ISO). Leather – Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers –, Part 2: Determination of 4-aminoazobenzene (ISO 17234-2, IULTCS/IUC 20-2). Geneva (Switzerland): ISO; 2011.
- 7) British Standards Institution (BSI). Safety of toys – Part 11: Organic chemical compounds – Methods of analysis (BS EN 71-11: 2005). London (UK): BSI; 2005.

(別紙) パラ-フェニルアゾアニリンの標準測定分析法

化学式: C ₁₂ H ₁₁ N ₃		分子量: 197.24	CAS No: 60-09-3
許容濃度等: 産業衛生学会		未設定	物性等: 沸点 (>360℃),
ACGIH		未設定	形状 (固体 (オレンジ色))
別名: 4-アミノアゾベンゼン, C.I. Solvent Yellow 1			
サンプリング		分析	
サンプラー:		分析方法: 高速液体クロマトグラフ分析法	
硫酸含浸ガラスファイバーフィルター (No. 303, ガステック社製) をフィルターカセット (No. 225-3LF, SKC 社製) に 2 枚セットする		抽出溶液: メタノール (5 ml)	
サンプリング流量: 1.0 l/min		抽出操作:	
サンプリング時間: 4 時間		振とう (5 min) → 遠心 (3000 rpm, 10 min)	
保存性:		装置: Prominence UFLC (島津製作所社製)	
冷蔵で、少なくとも 5 日間は変化がないことを確認 (添加量 5.00, 25.0, 250 µg)		カラム*: InertSustain C18 HP	
ブランク:		(3 µm, 100 x 3.0 mm) (GL サイエンス社製)	
検出されない		カラム温度: 40℃	
		移動相:	
		A: 0.1%ギ酸 + 10 mmol/l 酢酸アンモニウム	
		B: アセトニトリル	
		グラジエント条件*:	
		Time (min) A (%) B (%)	
		0.00 80 20	
		5.50 10 90	
		7.00 10 90	
		7.01 80 20	
		10.00 80 20	
精度		流速: 1.0 ml/min	
回収率:		R.T.: 4.0 min	
82–98% (5.00–500 µg) (4 h 捕集時)		検出器: フォトダイオードアレイ検出器	
検量線: 0.0500–100 µg/ml		(検出波長: 240–800 nm, 定量波長: 385 nm)	
定量法: 絶対検量線法		注入量: 4 µl	
装置の検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ)		*InertSustain C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm) (GL	
LOD (0.0497 µg/sample)		サイエンス社製) での分析も可能	
LOQ (0.166 µg/sample)			
測定法の定量下限 (LOQ)			
5.00 µg/sample			
個人ばく露測定 21 µg/m ³ (4 h 捕集時)			
適用: 個人ばく露測定			
妨害: BS EN71 で規制されている 16 種の色素は、妨害とならないことを確認している。			
参考文献:			