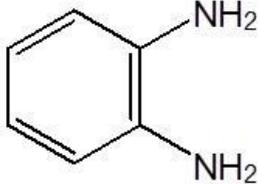


o-フェニレンジアミンの
測定・分析手法に関する検討結果報告書

1. はじめに

o-フェニレンジアミンは、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いる。表 1 に物理化学的性状および許容濃度を示す¹⁾。

表 1 o-フェニレンジアミンの物理化学的性状

CAS No.	95-54-5	
別名	o-ジアミノベンゼン 1,2-ベンゼンジアミン	
用途	アゾ染料、白髪染料 ゴム加硫促進剤、写真現像薬原料	
構造式		
分子量	108.14	
物性	比重	1.14g/cm ³ (20℃)
	沸点	256~258℃
	融点	103~104℃
	蒸気圧	1.3Pa(20℃)
	形状	茶~黄色の固体
許容濃度等	日本産業衛生学会	0.1mg/m ³
	OSHA	—
	NIOSH	—
	ACGIH	TLV-TWA 0.1mg/m ³

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り、許容濃度は日本産業衛生学会が 0.1 mg/m³、ACGIH は TLV-TWA 0.1 mg/m³ に設定している²⁾。そこで、気中濃度として TLV-TWA 0.1 mg/m³ の 1/1000 から 2 倍の濃度範囲を目標とした捕集および分析方法について検討を行った。

2. 文献調査

現在、o-フェニレンジアミンの測定およびその分析方法に関する公定法として OSHA Method No.87 が示されている³⁾。捕集方法は、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プリャを用いたろ過捕集法が採用されており、10 N 硫酸に溶解した o-フェニレンジアミン標準溶液を 1 層目のろ紙へ滴下し、室内空気を 1 L/min で 30 分間 (30 L) 吸引している。抽出は、ろ紙に 0.1 g/L EDTA 水溶液を 3 mL 添加し、攪拌・静置の後、上澄み液を回収し、HPLC (UV240 nm) にて測定している。

3. 予備検討

OSHA Method No.87 に準拠し、添加回収率 (通気試験) を行った。表 2-1 に試薬詳細、表 2-

2 に装置および分析条件を示す。捕集方法は、予備試験の添加回収率（通気試験）の操作フローに準じて行った（図 1）。捕集ポンプは SKC 製 AirChek2000 を使用した。サンブラは SKC 製 2 層式硫酸含浸ガラス繊維ろ紙 Treated Filter を用いた（図 2）。

表 2-1 予備検討に用いた試薬詳細

試薬名	メーカー	グレード	純度	Cat.No
o-フェニレンジアミン	和光純薬工業(株)	一級	95.0%	160-11022
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA2Na)	(株)同仁化学研究所	特級	99.5%	345-01865
硫酸	和光純薬工業(株)	特級	95.0%	192-04696
リン酸水素二ナトリウム (無水)	和光純薬工業(株)	特級	99.0%	197-02865
リン酸	和光純薬工業(株)	特級	85.0%	167-02166
アセトニトリル	和光純薬工業(株)	HPLC 用	99.8%	015-08633

1) o-フェニレンジアミン標準原液および混合標準溶液

標準原液は、o-フェニレンジアミンを各々20 mg 秤量し、10 N 硫酸で溶解の後、全量 10 mL に定容した。混合標準溶液は o-フェニレンジアミン標準原液を分取し、10 N 硫酸で適宜希釈した。

2) 抽出溶液

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.13 g を純水で溶解し、全量 1000 mL に定容した。

3) HPLC 溶離液 (50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) / アセトニトリル= 95 / 5)

50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) は、リン酸水素二ナトリウム (無水) を 7.10 g 秤量し、約 900 mL の純水で攪拌溶解する。そこへ、20%リン酸水溶液を 4.0 mL 添加し、純水を加えて全量 1000 mL に定容し調製した。

HPLC 溶離液は、50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) 950 mL、アセトニトリル 50 mL を混合し調製した。

表 2-2 装置および分析条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
カラム	LaChrom II C18 (4.6 mm .D.×250 mm、5 μm) P/N 889-0912 日立ハイテクサイエンス製
溶離液	50 mM Na ₂ HPO ₄ (pH7.0) / CH ₃ CN = 95 / 5
流速	1.0 mL/min
カラム温度	35 °C
検出器 (DAD)	測定波長 240 nm/バンド幅 10 nm(波長範囲 200~400 nm)
試料注入量	50 μL

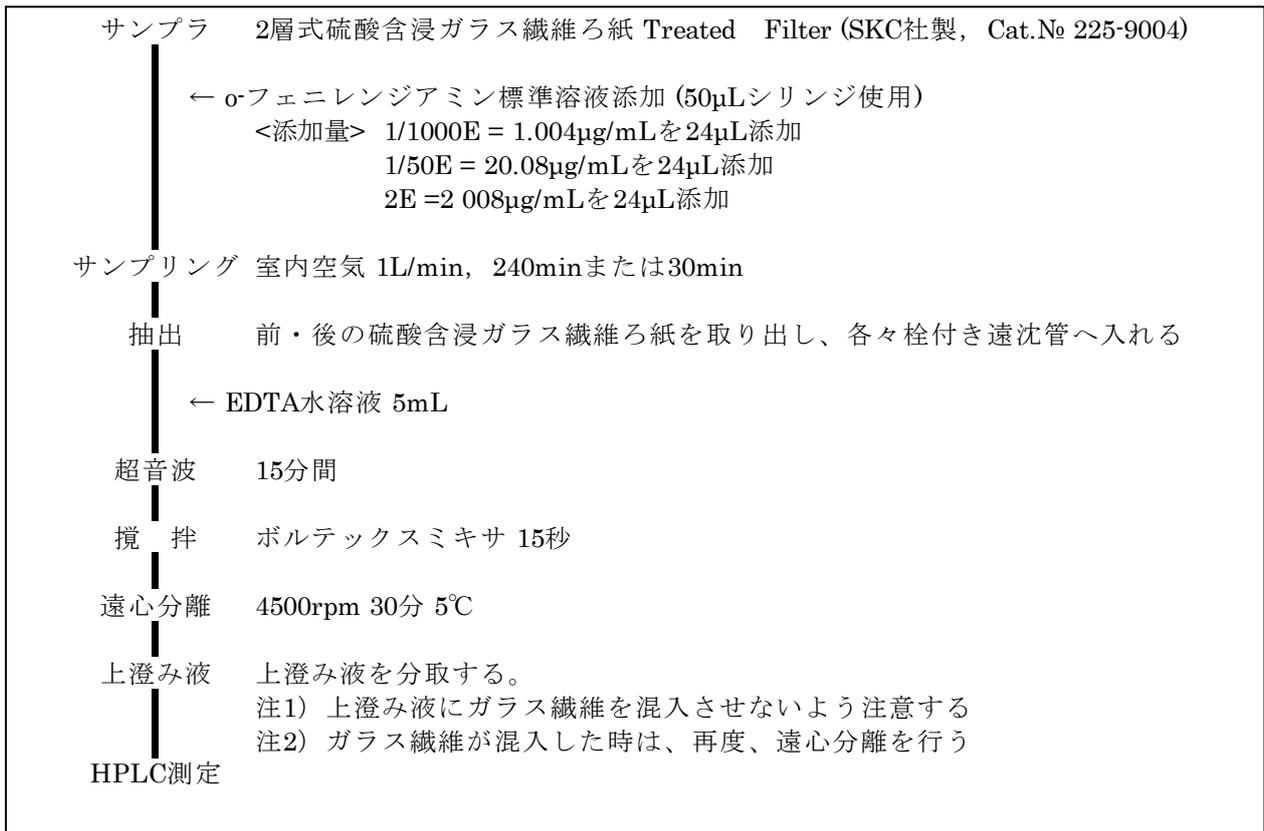


図1 予備試験の添加回収率(通気試験)の操作フロー

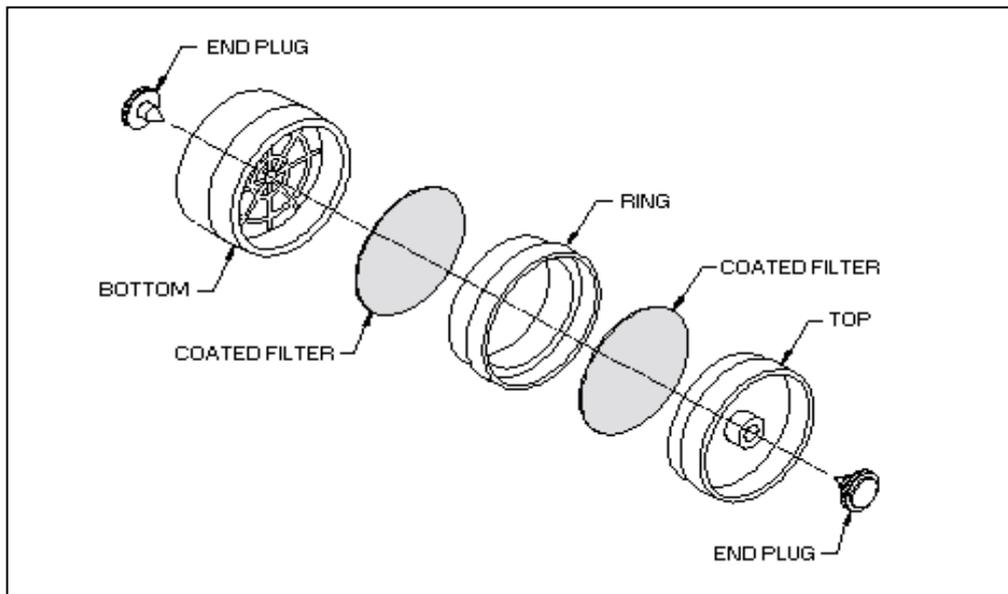


図2 カセット型サン普拉(2層式硫酸含浸ガラス繊維ろ紙)

予備試験による添加回収率(通気試験)の結果、高濃度(2E)の回収率は93.2%、1/50倍濃度は25.9%、1/1000倍濃度では0%となった。これは、サンプリング時の通気により、o-フェニレンジアミンが酸化分解したものと推測する。硫酸含浸ガラス繊維ろ紙を用いてアミノ基を安定な硫酸塩にしても、低濃度の場合には酸化分解を抑止できない事がわかった。このことから、ろ過捕集方法は現実的な手法ではないと判断する。

表 2-3 添加回収率（通気試験）結果（n=3） 室温 25.7～28.5℃、湿度 29.0～39.4%

捕集量 (L)	添加量 (μg)		サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
240	0.024	1/1000E	(n=3)	0.000	0.0	—	—
	0.48	1/50E		0.13	25.9	4.68	18.08
	48.1	2E		44.8	93.2	0.60	0.64

再度、文献調査による捕集方法を検討した。長野県環境保全研究所では、水質試料中の *o*-フェニレンジアミンを誘導体化し GC/MS で分析する方法を確立している⁴⁾。*o*-フェニレンジアミンは、水中の酸化性物質により分解するため、酸化防止剤として亜硫酸水素ナトリウムおよび EDTA を添加している。この方法を参考とし、インピンジャーを用いた液体捕集方法を検討した。

4. 捕集および分析条件

4-1. 試薬

検討には表 3 に示す試薬を使用した。

表 3 試薬詳細

試薬名	メーカ	グレード	純度	Cat.No
<i>o</i> -フェニレンジアミン	和光純薬工業㈱	一級	95.0%	160-11022
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA2Na)	㈱同仁化学研究	特級	99.5%	345-01865
亜硫酸水素ナトリウム	関東化学㈱	特級	67.4%(SO ₂)	37125-30
リン酸水素二ナトリウム (無水)	和光純薬工業㈱	特級	99.0%	197-02865
リン酸	和光純薬工業㈱	特級	85.0%	167-02166

1) 捕集溶液 (0.2%亜硫酸水素ナトリウム / 0.2%EDTA)

亜硫酸水素ナトリウム 2.0 g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2.214 g を純水で溶解し、全量 1000 mL に定容した。

2) *o*-フェニレンジアミン標準原液および混合標準溶液

標準原液は、*o*-フェニレンジアミンを各々 50 mg 秤量し、捕集溶液で溶解の後、全量 10 mL に定容した。混合標準溶液は *o*-フェニレンジアミン標準原液を分取し、捕集溶液で適宜希釈した。

3) HPLC 溶離液 (50mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) / アセトニトリル= 95/5)

50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) は、リン酸水素二ナトリウム (無水) を 7.10 g 秤量し、約 900 mL の純水で攪拌溶解する。そこへ、20%リン酸水溶液を 4.0 mL 添加し、純水を加えて全量 1000 mL に定容し調製した。

HPLC 溶離液は、50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH7.0) 950 mL、アセトニトリル 50mL を混合し調製した。

4-2. 捕集方法

捕集ポンプは SKC 製 AirChek2000 を使用した。サンプラはガラス製のマイクロインピンジャー（柴田科学製）を使用した（図 3）。

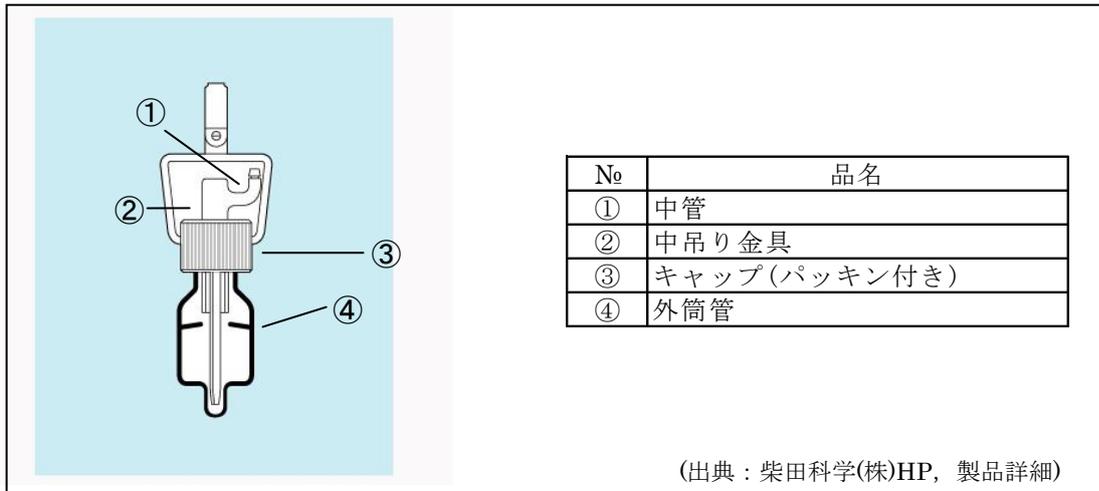


図 3 マイクロインピンジャー構成図

図 4 に添加回収率（通気試験）の操作フローを示す。マイクロインピンジャーによる捕集後の最終溶液量は、マイクロインピンジャーの内壁洗浄を行うため 10mL とした。o-フェニレンジアミン標準溶液の添加量は、HPLC 測定による o-フェニレンジアミンの定量下限値を考慮し、許容濃度 (0.1mg/m³) の 1/500、1/50、2 倍濃度になるよう捕集溶液 (8mL) に直接添加した。その後、アルミホイルでマイクロインピンジャーを遮蔽し、室内空気を 1L/min で 240 分間通気した。通気後は、マイクロインピンジャー内壁を捕集溶液 1.5mL で 2 回洗い込み、10mL 試験管へ回収し、10mL に定容した。この捕集溶液を HPLC 褐色バイアル瓶に移し入れ、試料溶液とした。

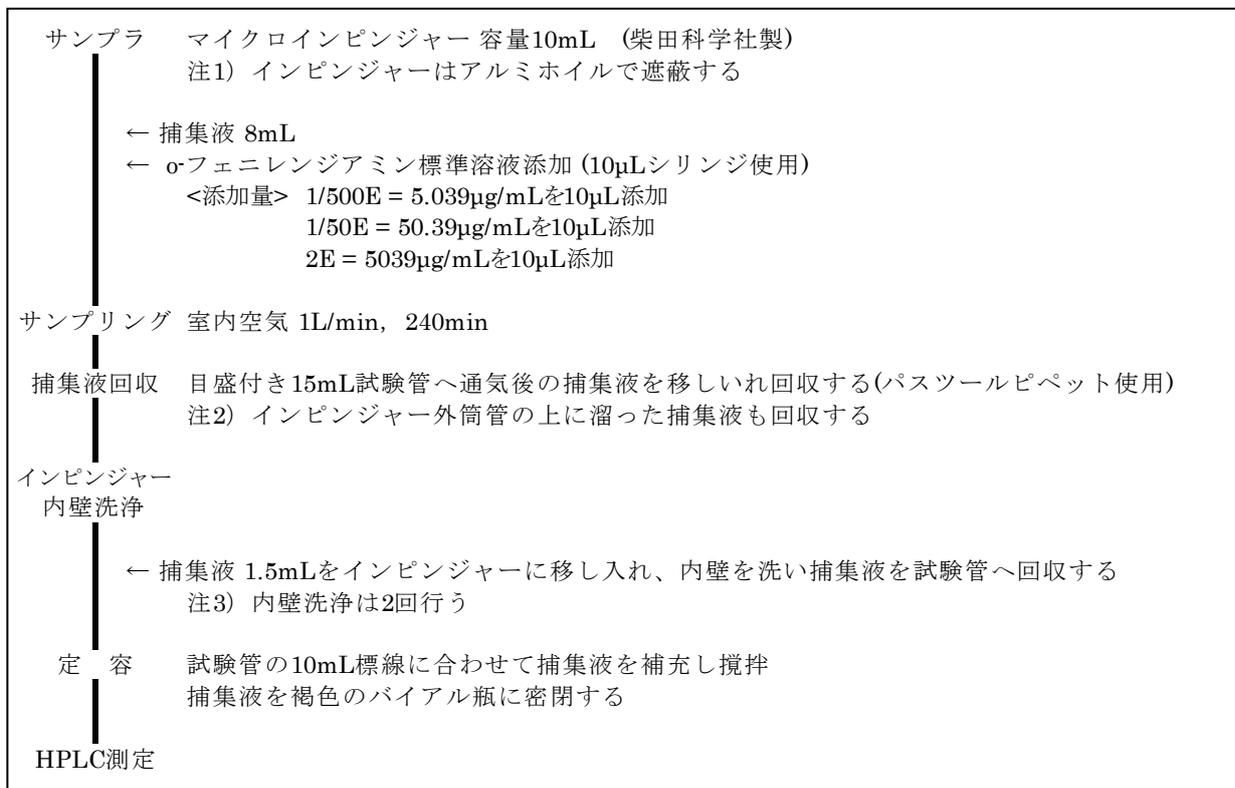


図 4 添加回収率(通気試験)の操作フロー

4-3. 分析条件

装置および分析条件を表 4 に示す。装置は、日立ハイテクサイエンス製の高速液体クロマトグラフ Chromaster を使用した。カラムは、LaChrom II C18 (日立ハイテクサイエンス製) を採用した。

表 4 装置および分析条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
カラム	LaChrom II C18 (4.6 mm I.D.,×250 mmL、5 μm) P/N 889-0912 日立ハイテクサイエンス製
溶離液	50mM Na ₂ HPO ₄ (pH7.0) / CH ₃ CN = 95 / 5
流速	1.0 mL/min
カラム温度	35 °C
検出器 (DAD)	測定波長 240 nm/バンド幅 10 nm(波長範囲 200~400 nm)
試料注入量	50 μL

5. ブランク

捕集溶液のブランクを確認した (図 5)。捕集溶液 (0.2% 亜硫酸水素ナトリウム / 0.2% EDTA) からは、*o*-フェニレンジアミンピークの保持時間に重なる成分は認められなかった。

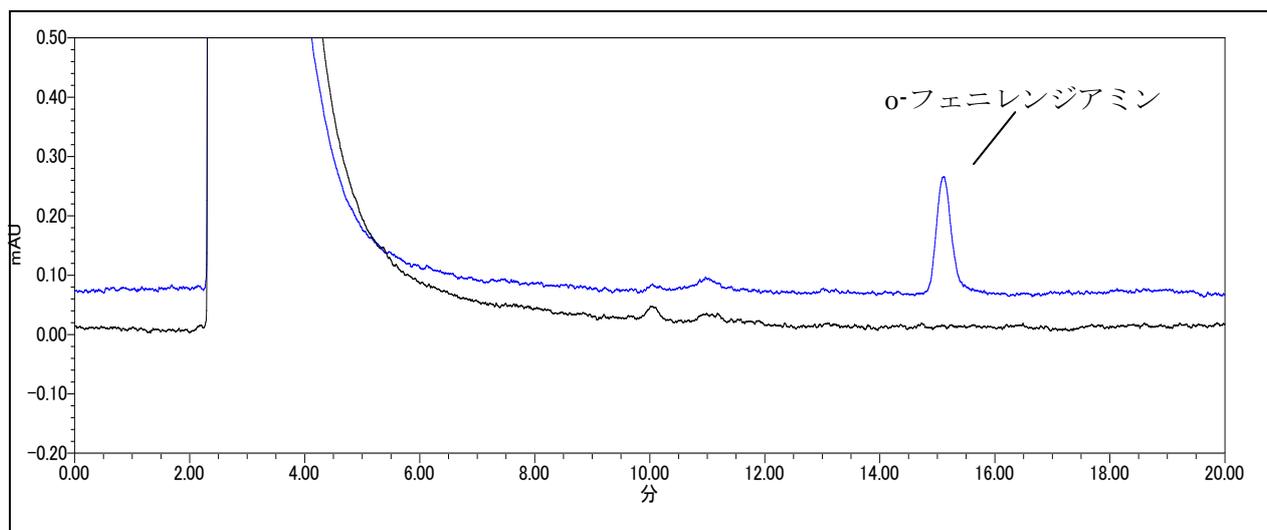


図 5 捕集溶液のクロマトグラム
(保持時間確認 : *o*-フェニレンジアミン標準溶液 0.05μg/mL)

6. 破過

破過試験は、マイクロインピンジャー2本をシリコンチューブ（10cm）で直列に連結した（図6）。上流側のマイクロインピンジャーは、捕集溶液（8mL）を移し入れ *o*-フェニレンジアミン標準溶液を許容濃度の2倍濃度になるように直接添加した。下流側のマイクロインピンジャーには、捕集溶液 8mL を入れた。サンプリング操作は、図4の添加回収率（通気試験）操作フローに準じて行った。表5に破過試験結果を示す。室内空気を 1L/min で 240分間通気させても、*o*-フェニレンジアミンは下流側のマイクロインピンジャーへ移行しない事を確認した。



図6 マイクロインピンジャー連結写真

表5 破過試験結果 (n=3) 室温 26.7~28.5°C、湿度 30.0~41.4%

No	捕集量 (L)	添加量 (μg)	マイクロインピンジャー（上流側）		マイクロインピンジャー（下流側）		
			定量値(μg)	回収率(%)	定量値(μg)	回収率(%)	
1	240	50.4	2E	46.7	92.8	0.0	0.0
2				48.1	95.4	0.0	0.0
3				47.7	94.6	0.0	0.0

7. クロマトグラム

o-フェニレンジアミン標準溶液のクロマトグラムおよびスペクトルを図7に示す。

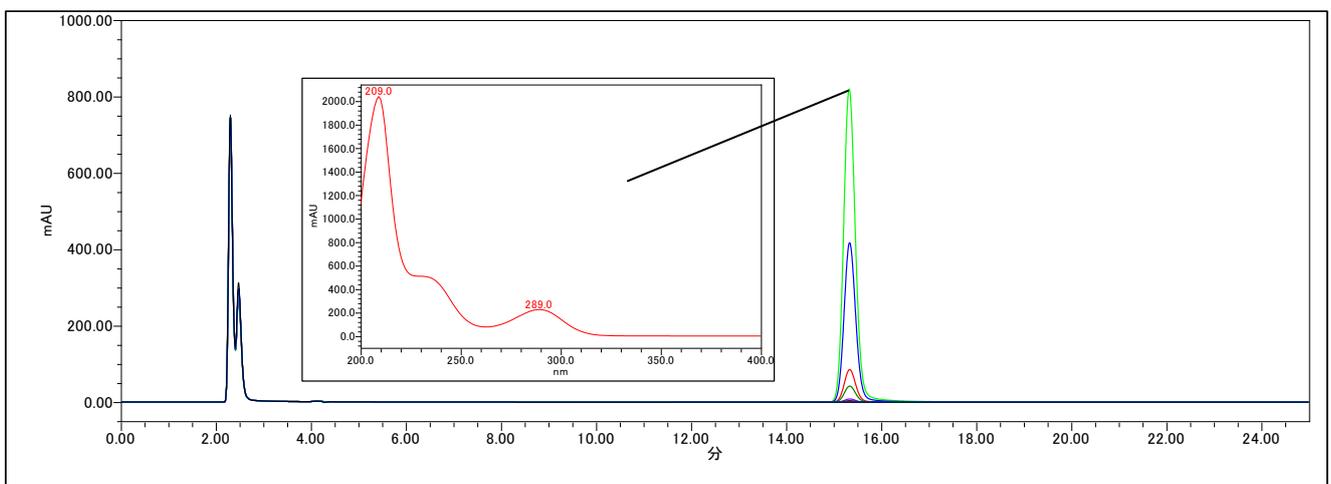


図7 *o*-フェニレンジアミン標準溶液(0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のクロマトグラム重ね書きおよびスペクトル

8. 検量線

検量線は、*o*-フェニレンジアミン標準溶液を捕集溶液で希釈し、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ の10段階の標準系列を調製し、直線性を確認した。表6にピーク面積値、図8には検量線を示す。0.005から0.5 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度範囲は相関係数 (R^2) 0.9996、0.005から100 $\mu\text{g/mL}$ の広範囲濃度においては相関係数 (R^2) 1.0000を示し、良好な直線性が得られた。

表6 ピーク面積値

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	面積値
0.000	0
0.005	670
0.010	1304
0.050	5454
0.100	11356
0.500	60852
1.000	132393
5.000	706735
10.000	1449614
50.000	7193610
100.000	14203356

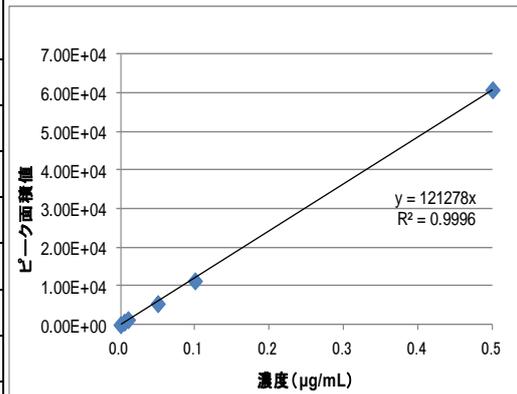


図8-1 検量線(0.005-0.5 $\mu\text{g/mL}$)

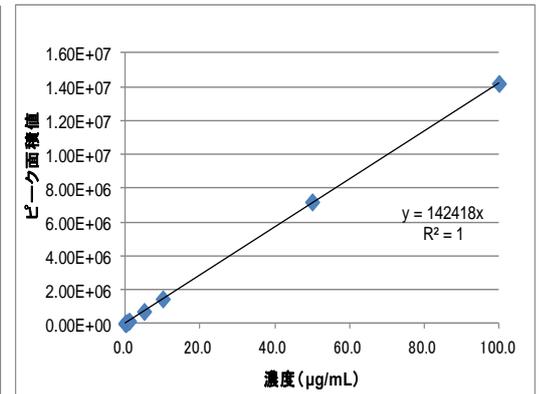


図8-2 検量線(0.005-100 $\mu\text{g/mL}$)

9. 検出下限および定量下限

o-フェニレンジアミン標準溶液 0.005 $\mu\text{g/mL}$ (1L/min で 240 分間通気した場合の気中濃度は 0.0002 mg/m^3 、許容濃度 0.1 mg/m^3 の 1/500 倍に相当) を 5 検体測定し、定量値から検出下限値 (3σ) および定量下限値 (10σ) を求めた。繰り返し測定による定量値の変動係数は 5.753%、検出下限値は 0.0009 $\mu\text{g/mL}$ 、定量下限値は 0.0030 $\mu\text{g/mL}$ であった。定量下限値より求められる気中濃度は、240L 通気 (最終溶液量 10mL) で 0.000123 mg/m^3 であり目標濃度の 1/813 となった (表7)。

表7 検出下限値および定量下限値

	検出下限値(3σ)	定量下限値(10σ)
溶液濃度($\mu\text{g/mL}$)	0.0009	0.0030
240L 通気による気中濃度 (mg/m^3)	0.000038	0.000123

<計算式>

$$\text{気中濃度 (mg/m}^3\text{)} = \frac{\text{定量下限値濃度 (}\mu\text{g/mL)} \times \text{最終試料液量 (mL)}}{\text{吸引空気量 (L)}}$$

10. 添加回収率（通気試験）

添加回収率（通気試験）は、図4の添加回収率（通気試験）操作フローに準じて行った。o-フェニレンジアミン標準溶液は、許容濃度の1/500、1/50、2倍濃度になるように、マイクロインピンジャーの捕集溶液（8mL）に直接添加した。表8に添加回収率（通気試験）結果を示す。回収率は93.0から95.1%であり、全ての水準において90%以上である事を確認した。

表8 添加回収率（通気試験）結果（n=3） 室温 26.7~28.5℃、湿度 30.0~41.4%

捕集量 (L)	添加量 (μg)		サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
10	0.050	1/500E	(n=3)	0.047	93.0	0.001	2.67
	0.50	1/50E		0.48	95.1	0.023	4.80
	50.4	2E		47.5	94.2	0.681	1.43

11. 保存性

保存性試験は、o-フェニレンジアミン標準溶液を、許容濃度の1/500、1/50、2倍濃度になるように、マイクロインピンジャーの捕集溶液（8mL）に直接添加した。その後、室内空気を1L/minで240分間吸引し通気した。通気後は、図4の添加回収率（通気試験）操作フローに準じてマイクロインピンジャーの内壁を捕集溶液で洗い込み、10mL試験管へ回収し10mLに定容した。この捕集溶液を褐色バイアル瓶に移し入れ密栓し、冷暗所（4℃）で保存した。保存日数は、通気直後の0日目を基準とし、1、4、7日後にHPLCで測定した。表9、図9に保存性試験結果を示す。いずれの濃度、日数においても保存率は90%以上を示し、7日間保存できる事を確認した。

表9 保存性試験結果（n=3） 室温 26.7~28.5℃、湿度 30.0~41.4%

添加量 0.050ug (1/500E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
10	0	(n=3)	0.047	93.0	100.0	0.001	2.67
	1		0.046	91.8	98.7	0.001	1.97
	4		0.047	92.2	99.1	0.001	2.31
	7		0.046	91.3	98.2	0.001	2.31
添加量 0.50ug (1/50E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
10	0	(n=3)	0.48	95.1	100.0	0.023	4.80
	1		0.48	95.6	100.5	0.016	3.40
	4		0.47	92.4	97.2	0.006	1.21
	7		0.47	92.3	97.1	0.012	2.64
添加量 50.4ug (2E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
10	0	(n=3)	47.5	94.2	100.0	0.681	1.43
	1		46.3	91.9	97.6	0.460	0.99
	4		47.3	94.0	99.7	0.274	0.58
	7		46.6	92.6	98.2	0.280	0.60

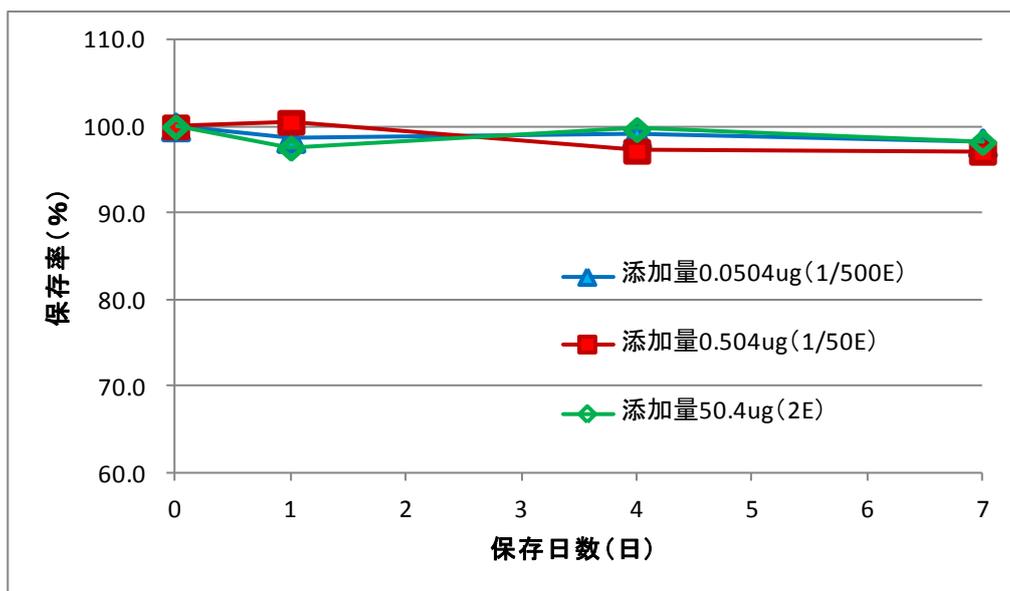


図 9 0-7 日間の保存安定性試験結果

1 2. まとめ

検討の結果、本法は、個人ばく露測定手法として TLV-TWA0.1mg/m³(ACGIH)の 1/500 から 2 倍となる 0.0002 から 0.2mg/m³の濃度範囲を分析できる手法であることを確認した。以上の検討結果を標準測定分析法として別紙にまとめた。

1 3. 参考文献

- 1) GHS モデルラベル・SDS 情報 製品安全データシート「オルト-フェニレンジアミン」2010 年 3 月 31 日改定、厚生労働省、
入手先<<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/95-54-5.html>>, 参照 2015/3/2.
- 2) 日本産業衛生学会, 2009、ACGIH, 2009.
- 3) OSHA (1991) Sampling and Analytical Methods; m-, o- and p-Phenylenediamine. Washington, DC, US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, at website.
入手先 < <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org087/org087.html>> , 参照 2015/3/2.
- 4) 長野県環境保全研究所, 水質試料中の「o-フェニレンジアミン」, 平成 23 年度長野県環境保全研究所調査研究テーマ

(別紙)

o-フェニレンジアミン標準測定分析法

化学式: $C_6H_8N_2$	分子量: 108.14	CASN ^o : 95-54-5
許容濃度等:	物性等	
ACGIH TLV-TWA: 0.1mg/m ³	沸 点: 256-258°C	
OSHA: 未設定	融 点: 103-104°C	
日本産業衛生学会: 0.1mg/m ³	蒸気圧: 1.3 Pa(20°C)	
	形 状: 茶から黄色の固体	
別名	o-ジアミノベンゼン、1,2-ベンゼンジアミノ	
サンプリング	分析	
<p>サンブラ: マイクロインピンジャー (柴田科学(株)製)</p> <p>サンプリング流量: 1.0 L/min</p> <p>サンプリング時間: 4時間(240 L) 要遮蔽</p> <p>保存性: サンプリング後、速やかに捕集液を回収し、密閉容器(褐色)に封入して冷蔵保存する。添加量 0.05 µg、0.50 µg、50.4 µg において冷蔵で7日間は安定。</p>	<p>分析方法: 高速液体クロマトグラフ法</p> <p>捕集溶液: 0.2% 亜硫酸水素ナトリウム / 0.2% EDTA^{※1)}</p> <p>※1) 硫酸水素ナトリウム 2.0 g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2.214 g を純水で溶解し、全量 1000 mL に定容する。</p> <p>標準溶液: o-フェニレンジアミンを捕集溶液で溶解する。</p>	
精度	分析条件	
<p>回収率; 添加量 0.05 µg の場合 93.0%</p> <p>(4 時間) 0.50 µg の場合 95.1%</p> <p>5.04 µg の場合 94.2%</p> <p>定量下限 (10σ)</p> <p>0.0030 µg/mL</p> <p>0.000123 mg/m³ (採気量; 240 L)</p> <p>検出下限 (3σ)</p> <p>0.0009 µg/mL</p> <p>0.000038 mg/m³ (採気量; 240 L)</p>	<p>機器: Chromaste (株)日立ハイテクサイエンス製)</p> <p>カラム: LaChrom II C18 (4.6mmI.D.,×250mmL,5µm)、P/N 889-0912 (株)日立ハイテクノロジーズ製)</p> <p>カラム温度: 35°C</p> <p>移動相: 50mM Na₂HPO₄(pH7.0)^{※2)} / CH₃CN = 95 / 5</p> <p>※2) リン酸水素二ナトリウム (無水) 7.10 g を純水で溶解し 20%リン酸水溶液 4 mL を添加。純水で全量 1 L に定容。</p> <p>流速: 1.0 mL/min</p> <p>検出器: UV240 nm</p> <p>試料注入量: 50 µL</p>	
	<p>検量線: 0.005~100 µg/mL の範囲で直線性が得られている。</p> <p>定量法: 絶対検量線法</p>	
適用: 個人ばく露濃度測定、作業環境測定		
妨害: -		
<p>1) GHS モデルラベル・SDS 情報 製品安全データシート「オルト・フェニレンジアミン」2010年3月31日改定、厚生労働省、 入手先<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/95-54-5.html>, 参照 2015/3/2.</p> <p>2) 日本産業衛生学会, 2009、ACGIH, 2009.</p> <p>3) OSHA (1991) Sampling and Analytical Methods; m-, o- and p-Phenylenediamine. Washington, DC, US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, at website. 入手先< https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org087/org087.html>, 参照 2015/3/2.</p> <p>4) 長野県環境保全研究所, 水質試料中の「o-フェニレンジアミン」, 平成 23 年度長野県環境保全研究所調査研究テーマ</p>		

作成日; 平成 27 年 3 月 3 日