

4-クロロ-オルト-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

目 次

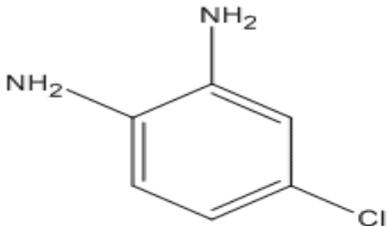
1. はじめに.....	- 3 -
2. 文献調査.....	- 3 -
3. 捕集および分析条件.....	- 4 -
3-1. 試薬および器具.....	- 4 -
3-2. 調整試薬.....	- 4 -
3-3. 捕集試験の方法と条件.....	- 4 -
3-4. 検出方法の選択、HPLC 測定条件.....	- 4 -
4. ブランク.....	- 5 -
5. 破過試験.....	- 5 -
6. クロマトグラム.....	- 6 -
7. 検量線.....	- 6 -
8. 検出下限および定量下限.....	- 7 -
9. 添加回収率.....	- 7 -
10. 保存安定性.....	- 7 -
11. 追加試験.....	- 8 -
12. まとめ.....	- 8 -
13. 参考文献.....	- 9 -

1. はじめに

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンは主に、染料製造、ヘアカラーの酸化剤などに使用される。人の健康に対する有害性は高く、発がん性が疑われている。¹⁾ (表 1) に 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの物理化学的性状を示した。

日本産業衛生学会では許容濃度値は設定されていない。このことから、機器分析を用い再現性のある最小濃度を目的濃度とし、その目的濃度の 500 倍の濃度を最大濃度として測定手法を検討した。対象とする気中濃度は(0.00357~1.787 ppm) なお、労働者の個人ばく露濃度を評価するために、4 時間にわたる大気の採取(吸引速度 0.2 L/min、通気量 48 L)を行った。

表 1 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの物理化学的性状

CAS No.	95-83-0	
別名	4-クロロベンゼン-1,2-ジアミン 4-クロロ-1,2-フェニレンジアミン 4-クロロ-1,2-ベンゼンジアミン	
用途	染料製造、ヘアカラーの酸化剤	
構造式	$C_6H_7ClN_2$ 	
分子量	142.59	
物性	比重	設定なし
	沸点	229.3 °C : Howard (1997)
	融点	67~70 °C : Howard (1997)
	蒸気圧	0.275Pa (25 °C 推定値)
	形状	固体
許容濃度等	日本産業衛生学会	設定なし
	OSHA	設定なし
	NIOSH	設定なし
	ACGIH	設定なし

2. 文献調査

文献調査から、フェニレンジアミン類の分析方法は OSHA Metod No.87²⁾に掲載されており、この公定法を引用して、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンを検討した。しかし、この公定法で示されている硫酸含浸フィルターの捕集方法では、低濃度範囲での捕集率が極めて低い結果となった。その後の文献調査でフェニレンジアミン類は、分解性が高いことが分かった。このことから、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンは、4 時間の通気中に分解が進むと判断した。そのため別の捕集方法として、排ガス中の液捕集方法³⁾を参考にし、低濃度から高濃度までの測定を検討した。

3. 捕集および分析条件

3-1. 試薬および器具

【試薬】

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン（特級）：東京化成工業株式会社

亜硫酸水素ナトリウム（特級）：和光純薬工業株式会社

アセトニトリル（残留農薬試験用）：和光純薬工業株式会社

りん酸水素二ナトリウム（特級）：和光純薬工業株式会社

りん酸二水素ナトリウム（特級）：和光純薬工業株式会社

エチレンジアミン四酢酸 EDTA（化学用）：株式会社同仁化学研究所

【器具】

マイクロインピンジャー：柴田科学株式会社（図1）

ポンプ：MP-Σ30 柴田科学株式会社

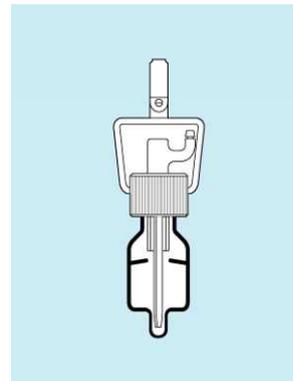


図1 マイクロインピンジャー（柴田科学製）
（出典：柴田科学㈱ 製品詳細）

3-2. 調整試薬

【捕集液】

0.2%亜硫酸水素ナトリウム/0.2%EDTA 溶液 (pH4.60)

亜硫酸水素ナトリウム 1.0 g、EDTA 1.107 g を水で溶解し、500 mL に定容した。

【移動相】

20 mM りん酸緩衝液 (pH3.85)

① りん酸水素二ナトリウム 2.84 g を水で溶解し 1000 mL に定容

② りん酸二水素ナトリウム 2.39 g を水で溶解し 1000 mL に定容

③ ①、②を混合する。

3-3. 捕集試験の方法と条件

捕集液に 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン 1.00 μg~500 μg を添加し、この濃度範囲における捕集および測定方法について検討を行った。

10 mL の捕集液が入ったマイクロインピンジャーに各濃度の 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン溶液を添加し、アルミホイルで遮光した。流量 0.2 L/min で 4 時間(通気量：48 L)通気後、マイクロインピンジャー中の捕集液をメスフラスコに丁寧に洗いこみ、20 mL に定容した。（4 時間の通気中に捕集液の大幅な減少はなかった。）この溶液をバイアル瓶に移し入れ、アルミホイルで遮光し HPLC 測定の試料溶液とした。

3-4. 検出方法の選択、HPLC 測定条件

分光光度計で、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの最大吸収波長を検出することにした。（図2）結果、240 nm で強い吸収を示した。このことより、本試験では、240 nm を検出波長として採用した。また、目的物質の検出面積を十分に確保するために、試料注入量を 50 μL としたところ、ピーク形状に問題はなく良好な結果であった。

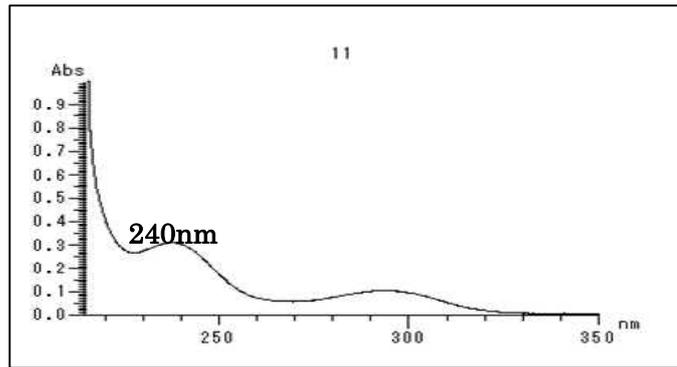


図2 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンのUV吸収スペクトル

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの測定条件を(表2)に記す。

表2 HPLC 測定条件

装置	UltiMate-3000 DIONEX 製
カラム	YMC-Triart C-18 (5 μm 4.6×150 mm)
移動相	20 mM リン酸緩衝液(PH3.8) : アセトニトリル=75:25
注入量	50 μL
温度	35°C
検出器	UV(240 nm)
流量	1.0 mL/分

4. ブランク

マイクロインピンジャーに 10 mL の捕集液を入れ、3-3. に記した操作手順で得られた試料溶液をブランクとして測定を行ったところ、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンのピークは認められなかった。

5. 破過試験

2本のマイクロインピンジャーを直列に繋ぎ、上流側のマイクロインピンジャーに、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン 500 μg を添加し、流速 0.2 L/min で4時間通気し破過の確認を行った。(表3)それぞれの捕集液を3-3. に記した操作手順で定容し測定した結果、上流側の捕集液から100%近くの回収率を得ることができた。また、下流側の捕集液からは、4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンのピークは検出されなかった。このことから、流速 0.2L/min で4時間通気を行っても破過しないことが確認できた。

表3 破過試験結果 (n=3)

添加量(μg)	上流側	下流側
	回収率(%) n=3	
500	98.11	0.0
	97.74	0.0
	96.56	0.0

6. クロマトグラム

3-4. (表2)に記す測定条件で4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン溶液を測定した。8.40分に4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンのピークを確認した。(図3)

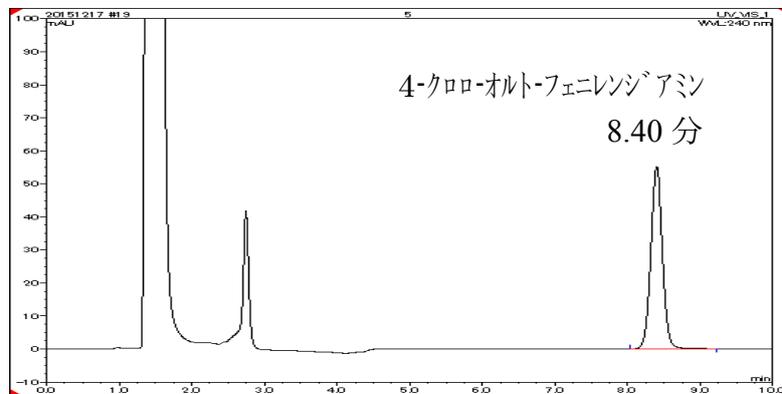


図3 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンのクロマトグラム

7. 検量線

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンを適量のメタノールで溶解し、捕集液で液列を作成した。これらの検量線の直線性について確認を行った。(表4)(図4)

結果、良好な直線性が得られた。

表4 標準試料液列

濃度(μg/mL)	面積(mAU×分)
0	0
0.05	0.094
0.1	0.199
0.25	0.505
0.5	0.987
1	2.043
5	10.381
10	20.698
25	49.557

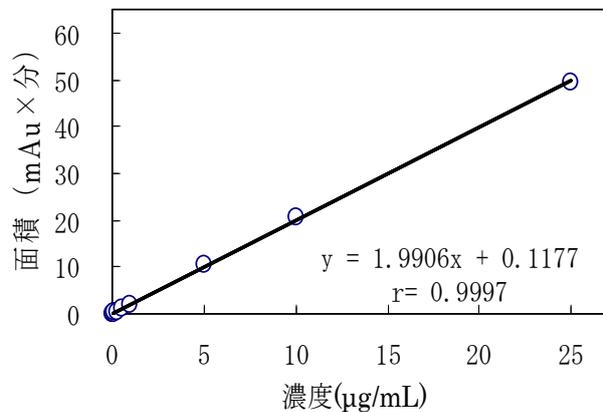


図4 検量線 (0~25μg)

8. 検出下限および定量下限

検量線作成で調整した 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン標準液の最低濃度 0.05 µg/mL(目標濃度)を 5 サンプル測定し、標準偏差(SD)を算出した。得られた標準偏差の 3 倍を検出下限値(LOD)とした。また、得られた標準偏差の 10 倍を定量下限(LOQ)とした。(表 5)

表 5 検出下限(LOD)と定量下限(LOQ)および気中濃度の定量下限

SD(µg/sample)	0.00020
LOD(µg/sample)	0.00060
LOQ(µg/sample)	0.00199
4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン量	0.00010 µg/mL
48L 採取時の気中濃度の定量下限	0.0071 ppb

また、以下に分析方法の定量下限を示す。(表 6)

表 6 測定方法の定量下限

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン量	0.05 µg/mL
48L 採取時の気中濃度の定量下限	3.58 ppb

9. 添加回収率

添加回収率試験は、以下の表に示す濃度を捕集液に添加し、3-3. に記された操作手順に従い試料を作成し、HPLC 測定方法にて求めた。その結果、すべての濃度において 92~99%の回収率が確認でき、RSD も 10%以内と良好な結果となった。(表 7)

表 7 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの添加回収率

添加量 (µg)	4 時間捕集としての濃度(ppm)	相当の濃度	回収率 (%) n=5		RSD (%)
			Mean	SD	
1	0.0036	目標濃度 (最小面積)	92	1.3	1.4
10	0.036	(最小面積×10)	96	2.1	2.2
500	1.79	(最小面積×500)	99	3.5	3.5

10. 保存安定性

9. 添加回収率試験と同じ濃度を捕集液に添加し、3-3. の操作手順に従い試料を作成後、4°Cの冷蔵庫で 0 日、1 日、3 日、5 日間保存した。保存後、HPLC 測定法にて保存安定性を確認した。その結果、10 µg、500 µg 添加試験においては、全ての保存期間で 92~100%の保存性が確認できた。しかし、1 µg 添加試験については 0 日間、1 日間の保存率は 90%を超えたが、3 日、5 日の保存率は 77%~83%であった。(表 8)

表8 4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの保存安定性

添加量(μg)	4時間捕集としての濃度(ppm)	相当の濃度	保存 日数	保存率 (%) n=3		RSD(%)
				Mean	SD	
1	0.0036	目標濃度 (最小面積)	0	96.6	4.17	4.32
			1	92.2	1.21	1.31
			3	83.2	1.73	2.08
			5	77.3	2.16	2.80
10	0.036	(最小面積×10)	0	100.3	1.39	1.39
			1	96.6	1.95	2.02
			3	97.6	1.07	1.09
			5	92.9	0.64	0.69
500	1.79	(最小面積×500)	0	97.4	2.81	2.88
			1	97.9	4.03	4.12
			3	95.5	3.16	3.31
			5	96.0	1.56	1.62

1 1. 追加試験

4時間のサンプリング後、直ちに定容、冷蔵保存ができない場合を仮定して、サンプリング後、常温、マイクロインピンジャーでの保存安定性試験を行った。

4時間通気後、マイクロインピンジャーの開放部をテフロンシールで密閉し、室温(22℃)、遮光した状態で保存試験を行った。(表9)

結果、10μg、500 μg 添加試験においては、1、3日間であっても90%以上の保存性が確認できた。しかし、1 μg 添加試験では、1日間の保存であっても保存率82%と低い結果となった。このことより、サンプリング後は速やかな定容、冷蔵保存が不可欠だと言える。

表9 常温(22℃)、瓶保存での4-クロロ-オルト-フェニレンジアミンの保存安定性

添加量(μg)	4時間捕集としての濃度(ppm)	相当の濃度	保存 日数	保存率 (%) n=3		RSD(%)
				Mean	SD	
1	0.0036	目標濃度 (最小面積)	1	82.27	3.11	3.78
			3	72.04	1.09	1.51
			5	69.05	1.98	2.87
10	0.036	(最小面積×10)	1	93.89	1.14	1.22
			3	94.60	1.76	1.86
			5	92.16	1.61	1.74
500	1.79	(最小面積×500)	1	96.90	0.34	0.35
			3	97.27	0.97	0.99
			5	101.26	3.23	3.19

1 2. まとめ

本研究では、作業環境中の4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン濃度を定量する方法を検討した。目標濃度(最小面積)の測定では精度、感度ともに良好な結果であることが確認できた。

また、保存安定性の確認においては、高濃度範囲(10 µg、500 µg 添加)では 5 日間では十分な保存ができることが確認できた。一方、低濃度範囲 (1.0 µg 添加) では 0 日、1 日であれば安定ではあるが、その後は減少傾向となった。追加試験からは、サンプリング後は速やかな定容、冷蔵保存が好ましいことが分かった。

結論として、本測定方法によって個人ばく露濃度は十分な精度と手法をもって測定することが可能であると考えられる。

1 3. 参考文献

- 1) 職場のあんぜんサイト：製品安全データシート 1-5 項
- 2) Occupational Safety & Health Administration : OSHA IMS Code Number 87
- 3) 排ガス中の有害物質の測定方法の検討(V) 「HPLC によるフェニレンジアミンの定量」環境化学 Vol.7、No.3 、p483-487 、1997 発行

(別紙)

4-クロロ-オルト-フェニレンジアミン 測定分析法

化学式 : C ₆ H ₇ ClN ₂	分子量 : 142.59	CASNo : 95-83-0
許容濃度等 : OSHA 設定なし NIOSH 設定なし ACGIH TLV-TWA-設定なし	物性等 沸 点 : 229.3 °C : Howard (1997) 融 点 : 67-70 °C : Howard (1997) 蒸気圧 : 0.275Pa (25 °C 推定値) 形 状 : 固体	
別名	4-クロロベンゼン-1,2-ジアミン	4-クロロ-1,2-フェニレンジアミン
サンプリング	分析	
液捕集 : 0.2% 亜硫酸水素ナトリウム/0.2% EDTA 溶液 10 mL (定容 20 mL) サンプラー : マイクロインピンジャー (柴田科学株式会社) サンプリング流量 : 0.2 L/min サンプリング時間 : 4 時間 (48 L) 保存性 : 1.0µg/20mL (冷蔵 1 日間保存可能) 10µg/20mL、500µg/20mL (冷蔵 5 日間保存可能)	分析方法 : 高速液体クロマトグラフ (HPLC)分析法 測定機器 : UltiMate-3000 (DIONEX 製) カラム : YMC-Triart C-18 (5 µm 4.6×150 mm) カラム温度 : 35°C 移動相 : 20 mM リン酸緩衝液 (pH3.85) : 水=(75 : 25) 流速 : 1.0 mL/min 検出器 : UV 240 nm 注入量 : 50 µL 検量線 : 0.05~25 µg/mL 上記範囲で直線性が得られている。 定量法 : 絶対検量線法	
精度		
添加回収率	1.0µg/20mL 92% 10µg/20mL 96% 500µg/20mL 99%	
検出下限 (3SD) 0.0006 µg/mL (0.00214 ppb, 0.2 L/min×4 時間)		
定量下限 (10SD) 0.00199 µg/mL (0.0071 ppb, 0.2 L/min×4 時間)		
適用 : 個人ばく露測定、作業環境測定		
妨害 : 酸化性物質、(4-クロロ-1,3-フェニレンジアミン 2-クロロ-1,4-フェニレンジアミン 異性体分離可能)		
参考文献 :		
1) 職場のあんぜんサイト : 製品安全データシート 1-5 項		
2) Occupational Safety & Health Administration : OSHA IMS Code Number 87		
3) 排ガス中の有害物質の測定方法の検討(V) 「HPLC によるフェニレンジアミンの定量」環境化学 Vol.7、No.3、p483-487、1997 発行		

作成日 ; 平成 28 年 2 月 15 日