

[4-[[4-(ジメチルアミノ)フェニル][4-[エチル(3-スルホベンジル)アミノ]フェニル]メチリデン]シクロヘキサン-2,5-ジエン-1-イリデン](エチル)(3-スルホナトベンジル)アンモニウムナトリウム塩
の測定・分析手法に関する検討結果報告書

1. はじめに.....	- 3 -
2. 文献調査.....	- 4 -
3. 捕集および分析条件.....	- 4 -
4. 抽出溶液.....	- 5 -
5. HPLC-PDA 分析条件.....	- 5 -
6. ブランク.....	- 6 -
7. 検量線.....	- 7 -
8. 検出下限および定量下限.....	- 7 -
9. 添加回収率（通気試験）.....	- 7 -
10. 保存安定性.....	- 8 -
11. まとめ.....	- 9 -
12. 参考文献.....	- 9 -
Appendix.....	- 10 -

1. はじめに

[4-[[4-(ジメチルアミノ)フェニル][4-[エチル(3-スルホベンジル)アミノ]フェニル]メチリデン]シクロヘキサン-2,5-ジエン-1-イリデン](エチル)(3-スルホナトベンジル)アンモニウムナトリウム塩 (別名: ベンジルバイオレット 4B, Benzyl Violet 4B, BV) の物理化学的性状を示した¹⁻³⁾ (表 1)。

表 1 BV の物理化学的性状

CAS No.	1694-09-3	
別名	ナトリウム=3-(N-{4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル](4-{N-エチル[(3-スルホナトフェニル)メチル]アミノ}フェニル)メチレン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン}-N-エチルアンモニオ)ベンゼンスルホナート ベンジルバイオレット4B (Benzyl Violet 4B) アシッドバイオレット49 (Acid Violet 49)	
用途	ウール、ナイロン及び絹 (浸染)、ウール及び絹 (直接プリント)、インキ、紙、レザー、アルマイト等の着色	
構造式		
化学式	C ₃₉ H ₄₀ N ₃ NaO ₆ S ₂	
分子量	733.88	
物性	比重	データなし
	沸点	データなし
	融点	245-250°C
	蒸気圧	データなし
	形状	細かい黒色粉末
許容濃度等	日本産業衛生学会	設定されていない
	ACGIH	設定されていない
発がん性	日本産業衛生学会	2B
	IARC	2B

現在のところ、許容濃度が設定されていないため、今回使用した分析装置の測定可能な範囲における捕集および分析方法について検討を行った。

2. 文献調査

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

3. 捕集および分析条件

3-1. 試薬

BV：東京化成工業株式会社（A0593）

現在市販されている標準品には、複数の類縁体が含まれており、純度が既知の標準品は入手できない。したがって、今回の検討では、使用した標準品の純度を100%として取り扱った。

メタノール：関東化学株式会社（高速液体クロマトグラフィー用，25183-2B）

アセトニトリル：関東化学株式会社（高速液体クロマトグラフィー用，01031-2B）

HPLC 移動相：5 mM リン酸二水素アンモニウム+5 mM リン酸水素二ナトリウム（pH：6.9）

リン酸二水素アンモニウム（和光純薬工業株式会社，特級，012-03305）0.575 g およびリン酸水素二ナトリウム（和光純薬工業株式会社，特級，197-02865）0.700 g を精製水 1 L に溶解する。

抽出溶液：精製水/メタノール（7/3）

精製水 700 mL とメタノール 300 mL を混合する。

3-2. 捕集方法

BVは常温・大気圧下で固体であるため、ろ過捕集方法を採用し、サンプラーとしてガラスファイバーろ紙（AP20，メルクミリポア）を用いた（表2）。

3-3. 分析方法

捕集後のサンプルは、抽出溶液 5 mL で抽出し、高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器（HPLC-PDA）で分析した（表2）。

表2 BVの捕集および分析条件

捕集方法			
サンプラー	ガラスファイバーろ紙（AP20，メルクミリポア）を直径37 mmにカットし、フィルターカセット（225-3LF，SKC）の最後部に1枚セットする。		
捕集流量	1 L/min（最大捕集時間：4時間）		
分析方法			
装置	Prominence UFLC（株式会社島津製作所）		
検出器	フォトダイオードアレイ（PDA）検出器 （検出波長：240-800 nm，定量波長：592 nm）		
移動相	A：5 mM リン酸二水素アンモニウム+5 mM リン酸水素二ナトリウム B：アセトニトリル		
カラム	InertSustain C18（5 μm，150×4.6 mm）（ジーエルサイエンス株式会社）		
カラム流量	1.0 mL/min（40℃）		
グラジエント条件	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	85	15
	20.00	15	85

	20.01	85	15
	30.00	85	15
注入量	10 μ L		
前処理			
抽出液	精製水/メタノール (7/3) (5 mL)		
抽出操作	振とう (5 min) →遠心 (3000 rpm, 10 min) →ろ過 (DISMIC, 13HP020AN, アドバンテック東洋株式会社)		

4. 抽出溶液

抽出溶液を決定するために、5種類の溶媒（精製水、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール）について検討した。選定方法は、BV 0.2 g を 10 mL の容量で溶解可能な溶媒とした。BV は、5種類の溶媒中、精製水のみで溶解したが（メタノールには微溶）、溶解溶液は粘性が高く、発泡が見られた。このような溶液を用いて、正確な分析操作を行うことは著しく困難であるため、粘性および発泡を抑えた溶液を得るために、精製水とメタノールの混合溶液について検討した。検討の結果、抽出溶液には精製水/メタノール (7/3) を採用した。フィルターに BV 標準液 (20000 μ g/mL) を添加 (25 μ L) し、15 分間室温放置した後、抽出及び分析を行った。抽出率は $100 \pm 0.9\%$ ($n = 5$) と良好であった。

5. HPLC-PDA 分析条件

BV の分析には HPLC-PDA を用いることとし、いくつかの分析条件⁴⁾⁷⁾を試した結果、ISO 17234 の分析条件が最も良好な結果を示した。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。それゆえ、ISO 17234 の分析条件をベースとして BS EN 71-11 のターゲット色素 16 種類 (Appendix) の妨害を調べ、分析条件の最適化を行った。

決定した分析条件を用いて標準液 (100 μ g/mL) を分析した結果、複数のピークが観察された (図 1)。最も大きなピーク (R.T. : 9.7 min) を定量に用いることとし、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 592 nm 付近であったため (図 2)、定量波長は、592 nm に決定した。

また、フィルターに BV (25.0 μ g) を添加し、1 L/min で 4 時間通気したサンプルのクロマトグラムを以下に示した (図 3-A)。

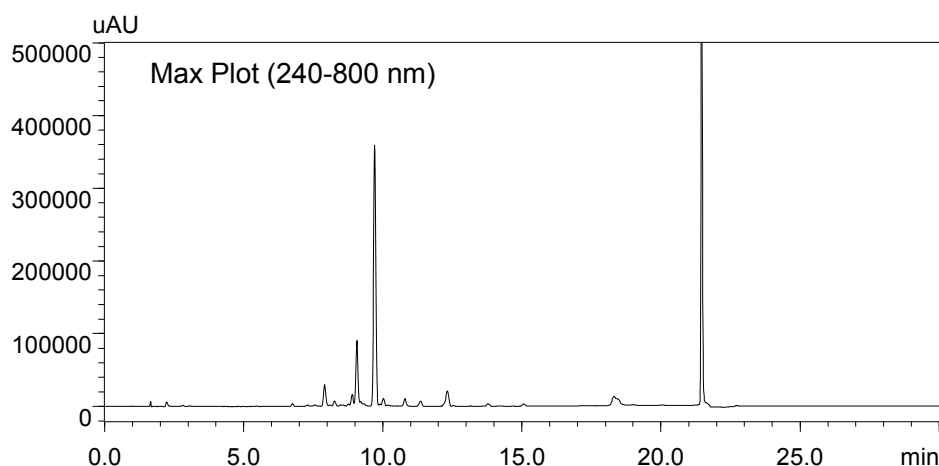


図 1 BV 標準液 (100 μ g/mL) のクロマトグラム

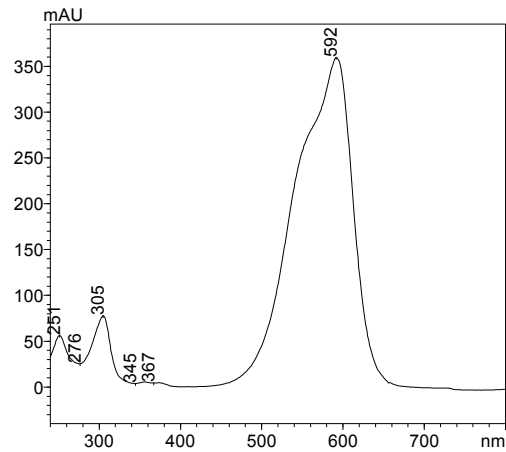


図2 BVの吸収スペクトル

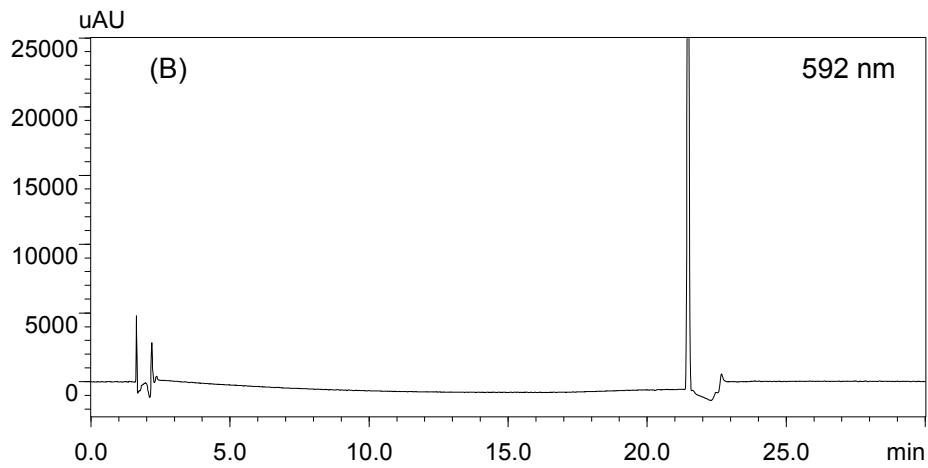
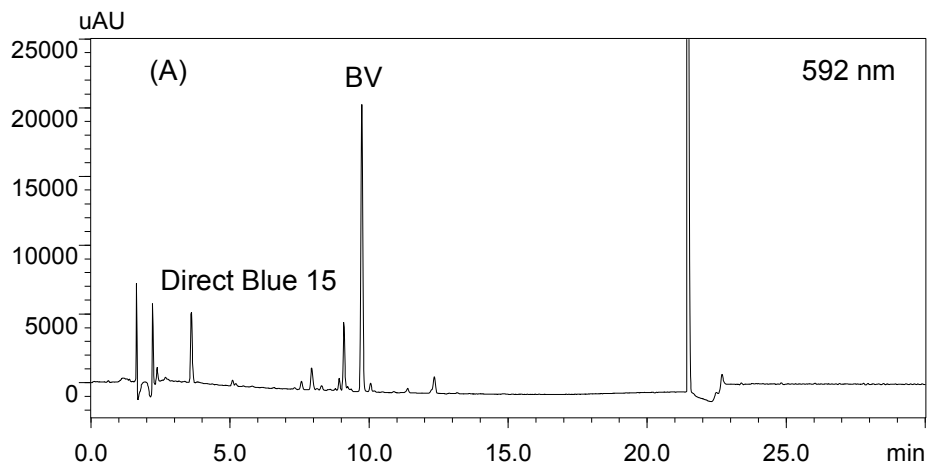


図3 フィルターにBVを添加したサンプル (A) 及び
サンプラーブランク (B) のクロマトグラム

6. ブランク

抽出溶液およびサンプラーのブランクの確認を行ったところ、BVは検出されなかった(図3-B)。

7. 検量線

BV を抽出溶液で溶解および希釈し、0.0500–100 $\mu\text{g/mL}$ 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4、表3）。

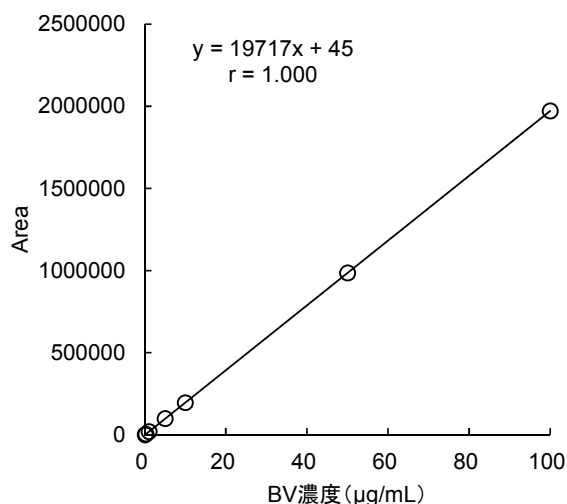


図4 BVの検量線

8. 検出下限および定量下限

検量線として調製したBV標準液の最低濃度（0.0500 $\mu\text{g/mL}$ ）を5サンプル分析し、得られた測定値の標準偏差（SD）の3倍および10倍をそれぞれ分析装置の検出下限値（LOD）及び定量下限値（LOQ）とした（抽出溶液量：5 mL）。また、分析装置のLOQ付近（0.250 $\mu\text{g/sample}$ ）の添加回収試験の結果も良好であったため、0.250 $\mu\text{g/sample}$ を測定法のLOQとし、個人ばく露測定（240 L採気）の定量下限値は、1 $\mu\text{g/m}^3$ となった（表3）。

表3 検出・定量下限

検量線	直線範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0500–100
	相関係数	1.000
分析装置	LOD ($\mu\text{g/sample}$)	0.0460
	LOQ ($\mu\text{g/sample}$)	0.153
測定法	LOQ ($\mu\text{g/sample}$)	0.250
	240 L採気時の気中濃度 ($\mu\text{g/m}^3$)	1

9. 添加回収率（通気試験）

フィルターにBV標準液（10.0–20000 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加（25 μL ）し、室内空気（19.5–22.9 $^{\circ}\text{C}$ ，30–49%）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。添加回収率は94–102%と良好であった（表4）。

表4 添加回収率

添加量 (μg)	回収率(%)			
	Mean		SD	RSD (%)
0.250	94	±	3.8	4.1
1.25	97	±	1.6	1.6
5.00	100	±	0.6	0.6
25.0	102	±	0.7	0.7
250	100	±	0.9	0.9
500	99	±	1.3	1.3

n = 5

表5 保存安定性

添加量 (μg)	保存日数	保存率(%)			
		Mean		SD	RSD (%)
0.250	0	100	±	4.4	4.4
	1	103	±	3.6	3.5
	3	97	±	2.2	2.3
	7	98	±	2.1	2.2
1.25	0	100	±	1.2	1.2
	1	96	±	2.1	2.2
	3	95	±	1.5	1.6
	7	97	±	2.6	2.7
25.0	0	100	±	0.7	0.7
	1	100	±	0.4	0.4
	3	100	±	0.5	0.5
	7	100	±	0.4	0.4
500	0	100	±	0.3	0.3
	1	101	±	0.7	0.7
	3	100	±	1.5	1.5
	7	99	±	0.3	0.4

n = 3

10. 保存安定性

フィルターに BV 標準液 (10.0, 50.0, 1000 および 20000 μg/mL) を添加 (25 μL) し、室内空気 (18.6–21.8°C, 29–32%) 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 (4°C) した。そして、捕集直後を基準として、1, 3, 7 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 7 日目まで保存可能であることが確認された (表 5)。

1 1. まとめ

本法は、個人ばく露濃度測定法（4時間サンプリング）として、1–2083 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲を測定することが可能である。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 2. 参考文献

- 1) 厚生労働省, 職場のあんぜんサイト. 製品安全データシート ([4 - [[4 - (ジメチルアミノ) フェニル] [4 - [エチル (3 - スルホベンジル) アミノ] フェニル] メチリデン] シクロヘキサン - 2, 5 - ジエン - 1 - イリデン] (エチル) (3 - スルホナトベンジル) アンモニウムナトリウム塩) 2006.
- 2) Japan Society for Occupational Health. Recommendation of occupational exposure limits (2015-2016). *J Occup Health* 2015; 57: 394–417.
- 3) International Agency for Research on Cancer (IARC). Benzyl violet 4B. 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. 58.
- 4) Takeuchi A, Jukurogi A, Kaifuku Y, Natsumeda S, Ota H, Yamada S, et al. Determination method for p-Phenylazoaniline and 2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline in workplace air by high-performance liquid chromatography. *J Occup Health* 2013; 55: 43-6.
- 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.

BS EN 71-11 のターゲット色素 16 種類

Name	CAS No.	検討で使用したメーカー
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	Fluka
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 Violent 49	1694-09-3	東京化成

化学式：C ₃₉ H ₄₀ N ₃ NaO ₆ S ₂	分子量：733.88	CAS No.：1694-09-3															
許容濃度等 日本産業衛生学会：設定されていない ACGIH：設定されていない 発がん性 日本産業衛生学会：2B IARC：2B	物性等 沸点：データなし 融点：245-250℃ 蒸気圧：データなし 形状：細かい黒色粉末																
別名：[4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル][4-[エチル(3-スルホベンジル)アミノ]フェニル]メチリデン]シクロヘキサン-2,5-ジエン-1-イリデン](エチル)(3-スルホナトベンジル)アンモニウムナトリウム塩、アシッドバイオレット49 (Acid Violet 49)																	
サンプリング	分析																
<p>サンプラー：グラスファイバーろ紙 (AP20, メルクミリポア) を直径 37 mm にカットし、フィルターカセット (225-3LF, SKC) の最後部に 1 枚セットする。</p> <p>サンプリング流量：1 L/min サンプリング時間：4 時間 (240 L)</p> <p>保存安定性：冷蔵で少なくとも 7 日間までは変化がないことを確認した (添加量：0.250, 1.25, 25.0, 500 µg)。</p> <p>ブランク：検出されない。</p>	<p>分析方法：高速液体クロマトグラフ分析法</p> <p>抽出溶液：精製水/メタノール (7/3) (5 mL) 抽出操作：振とう (5 min) → 遠心 (3000 rpm, 10 min) → ろ過 (DISMIC, 13HP020AN, アドバンテック東洋株式会社)</p> <p>装置：Prominence UFLC (株式会社島津製作所) カラム：InertSustain C18 (5 µm, 150×4.6 mm) (ジールサイエンス株式会社) カラム温度：40℃ 移動相： (A) 5 mM リン酸二水素アンモニウム + 5 mM リン酸水素二ナトリウム (pH：6.9) (B) アセトニトリル</p>																
精度	グラジエント条件：																
<p>添加回収率 (通気試験)： 94-102% (添加量：0.250-500 µg) (4 時間通気)</p> <p>検量線：0.0500-100 µg/mL 定量法：絶対検量線法 装置の検出下限値 (LOD) と定量下限値 (LOQ)： LOD (0.0460 µg/sample) LOQ (0.153 µg/sample) 測定法の定量下限値 (LOQ)： 0.250 µg/sample 個人ばく露測定 1 µg/m³ (4 時間採気時)</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>30.00</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table> <p>流速：1.0 mL/min R.T.：9.7 min 検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (検出波長：240-800 nm, 定量波長：592 nm) 注入量：10 µL</p>		Time (min)	A (%)	B (%)	0.00	85	15	20.00	15	85	20.01	85	15	30.00	85	15
Time (min)	A (%)	B (%)															
0.00	85	15															
20.00	15	85															
20.01	85	15															
30.00	85	15															
適用：個人ばく露濃度測定法として、1-2083 µg/m ³ の範囲を測定することが可能である。																	
妨害：BS EN 71-11 のターゲット色素 16 種類は、妨害とならないことを確認している。																	
参考文献：																	
<ol style="list-style-type: none"> 厚生労働省, 職場のあんぜんサイト. 製品安全データシート ([4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル][4-[エチル(3-スルホベンジル)アミノ]フェニル]メチリデン]シクロヘキサン-2,5-ジエン-1-イリデン](エチル)(3-スルホナトベンジル)アンモニウムナトリウム塩) 2006. Japan Society for Occupational Health. Recommendation of occupational exposure limits (2015-2016). J Occup Health 2015; 57: 394-417. International Agency for Research on Cancer (IARC). Benzyl violet 4B. 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. 58. Takeuchi A, Jukurogi A, Kaifuku Y, Natsumeda S, Ota H, Yamada S, et al. Determination method for p-Phenylazoaniline and 2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline in workplace air by high-performance liquid 																	

chromatography. J Occup Health 2013; 55: 43-6.

- 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.
-

作成日：平成28年2月16日