

水質、底質及び魚類中のジフェニルアミンの分析法について

Analytical Method of Diphenylamine in Water, Sediment and Fish

担当者 西野茂幸

1. はじめに

本報告は、平成元年度に環境庁より化学物質環境汚染実態調査の一環として、化学物質分析法開発調査の委託を受け、水質、底質及び魚類中のジフェニルアミンの分析法を開発したものである。

2. 分析法

水質試料については、ヘキサンで抽出後、脱水、濃縮し、アルミナカラムによりクリーンアップを行い、GC/MS で定量する。底質試料については、メタノールで抽出後、ヘキサンに転溶し、アルミナカラム及びカートリッジカラムでクリーンアップを行った後、水質試料と同様に処理する。生物試料については、アセトニトリルで抽出後、脂質を除去し、ヘキサンに転溶した後、水質試料と同様に処理する。(注1)

試験法

【試料の前処理】

〔水質試料〕 試料 1ℓ を 2ℓ の分液ロートにとり、pH を 7~9 に調整し(注2)、塩化ナトリウム 50g を添加し(注3)、ヘキサン 100ml を加え 10 分間振とうし抽出する。静置後、ヘキサン層を分取し、さらにヘキサン 100ml を加えて同様の操作を行う。ヘキサン層を合わせて、精製水 100ml で 2 回水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧 KD 濃縮器で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

〔底質試料〕 試料 20g を 100ml のコニカルビーカーにはかり取り、メタノール 50ml を加えポルトロン型ホモジナイザーで 5 分間ホモジナイズ抽出する。静置後、上澄液を吸収ろ過する(注4)。さらにメタノール 50ml を加え同様の操作を行った後、ろ液を分液ロートに移す。これに 5% 食塩水 500ml 及びヘ

キサン 100ml を加え 10 分間振とうして、ヘキサンに転溶する。静置後、ヘキサン層を分取し、さらにヘキサン 50ml を加え同様の転溶操作を行う。ヘキサン層を合わせて、精製水 100ml で 2 回水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧 KD 濃縮器で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

〔生物試料〕 試料 20g を 100ml のコニカルビーカーにはかり取り、アセトニトリル 50ml を加え底質試料と同様に 5 分間ホモジナイズ抽出する。静置後、上澄液を吸収ろ過する(注4)(注5)。さらにアセトニトリル 50ml を加え同様の操作を行った後、ろ液を分液ロートに移す。これにアセトニトリル飽和ヘキサン 20ml を加え、1 分間激しく振とうする。10 分静置後、下層(アセトニトリル層)を別の分液ロートに移し、さらにアセトニトリル飽和ヘキサン 10ml を加え同様の操作を行い、脂質を除去する。その後、アセトニトリル層に 5% 食塩水 500ml 及びヘキサン 100ml を加え 10 分間振とうしてヘキサンに転溶する。静置後、ヘキサン層を分取し、さらにヘキサン 50ml を加え同様の転溶操作を行う。ヘキサン層を合わせて、精製水 100ml で 2 回水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水し減圧 KD 濃縮器で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

【試料液の調整】

〔水質地料〕 前処理液をアルミナカラムに移し、濃縮受器を約 1ml のヘキサンで 2 回洗い、洗液をカラムに加える。液面をカラムヘッドまで下げ、ヘキサン・アセトン (99:1) 70ml を流下させる。この溶出分画は捨てる(注6)。次に、ヘキサン・アセトン (97:3) 50ml を流下し、ジフェニルアミンを溶出させ、この分画を KD 濃縮してヘキサンで 2ml に定容し、測定試料液とする。

〔底質試料〕 水質試料と同様にアルミナカラムでグリーンアップを行った試料液を約1mlに濃縮しガラス製注射筒に接続したフロリジルカートリッジカラム(注7)に移し、濃縮受器、注射筒を約1mlのヘキサンで洗いカラムに加えた後、ヘキサン・エーテル(95:5)10mlを自然流下させ、これを分取しKD濃縮してヘキサンで2mlに定容し、測定試料液とする。

〔生物試料〕 水質試料と同様にアルミナカラムでグリーンアップを行い、2mlに定容し測定試料液とする。

〔空試料液の調整〕

試料と同じ量の精製水を用い【試料の前処理】及び【試料液の調整】と同様に操作を行い、得られたものを空試料液とする。

〔標準液の調整〕

標準品100mgを精秤し、ヘキサンで正確に100mlとして、これを標準原液(約1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とする。使用時に、添加用はメタノールで希釈し、検量線用はヘキサンで希釈し、0.05~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。

〔測定〕

〔GC/MSの条件〕

カラム: SBP-5 (5%フェニルメチルシリコン)
0.53mm \times 15m 膜厚0.5 μm

カラム温度: 105 $^{\circ}\text{C}$ →140 $^{\circ}\text{C}$ 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温(注8)

注入口温度: 200 $^{\circ}\text{C}$

注入方法: ダイレクト注入

キャリアーガス: He 115cm/sec

セパレータ温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

イオン源温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電圧: 70eV

設定質量数: m/z 169, 167

〔検量線〕

0.05~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準液2 μl をGC/MSに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成する。

〔定量〕

試料液2 μl をGC/MSに注入し、得られたピーク面積と検量線から定量値を求める。

〔計算〕

計算値($\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $\mu\text{g}/\text{g}$) = 検出量 (ng) \times

$\frac{\text{最終試料量 (ml)}}{\text{GC/MS 注入量 } (\mu\text{l})} \times \frac{1}{\text{試料量 (ml 又は g)}}$

〔検出限界及び定量限界〕 本分析法に基づく検出限界及び定量限界を下記に示す。(注9)

	試料量	検出限界	定量限界
水質試料	1 ℓ	0.04 $\mu\text{g}/\ell$	0.12 $\mu\text{g}/\ell$
底質試料	20g	1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$	—
生物試料	20g	2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	—

試薬・器具

〔試薬〕

ジフェニルアミン標準品: 和光純薬製 試薬特級

N-ニトロソジフェニルアミン標準品: 東京化成製 試薬特級

ヘキサン, アセトニトリル, メタノール, アセトン, エーテル 残留農業試験用

塩化ナトリウム 試薬特級

無水硫酸ナトリウム 試薬特級

ハイフロスーパースセル: Johns-Manvill社製

カートリッジカラム: Waters社製 SEP-PAK
フロリジル (Sample Size 0.9g)

アルミナ: ICN社製 Alumina B-Super-Iを
使用前に約10倍量のアセトンで30分間、2~3
回スターラーで攪拌洗浄し風乾後、さらにヘキサ
ンで洗浄して風乾後、400 $^{\circ}\text{C}$ 3時間活性化して用
いる。

〔器具〕

ホモジナイザー: ポリトン型ホモジナイザー
アルミナカラム: クロマト管(10mm \times 30cm)にヘ
キサン約5mlを加え、活性化したアルミナ3gを
少しずつ乾式充填し、無水硫酸ナトリウム2gを
積層したものを使用する。

ガラス器具: 分液ロート, 減圧KD濃縮器, クロマ
ト管等のガラス器具は使用前にヘキサンで洗浄し
た後、使用する。

~~~~~注 解~~~~~

- (1) N-ニトロソジフェニルアミンは光分解によりジフェニルアミンに変化する可能性があるため、試料採取後、試料は直ちに遮光し、また、試料、試料液の保存は遮光して行う。また分析操作は褐色ガラス器具、アルミ箔等を用いて遮断して行う必要がある。
- (2) ジフェニルアミンは、pHが酸性側では NO_2 と反

応してN-ニトロソジフェニルアミンを生成するため、0.1N-NaOHでpHを7~9に調整して抽出する。

- (3) 海水では、塩化ナトリウムの添加は不要である。
- (4) 内径40mm程度のガラス製吸引ロート(ここでは桐山ロートを使用した。)に円形に切ったNo.5 Aのろ紙及びろ過助剤のハイフラスーパーセル2gを敷き、底質ではメタノール、生物ではアセトニトリル約20mlで洗浄した後、吸引ろ過を行う。
- (5) 2回目の吸引ろ過で、ハイフラスーパーセルがろ液に入り、ろ液が白く濁りヘキサン転溶時に若干エマルジョンを生成する場合があるが、その後の水洗いでエマルジョンは消失する。
- (6) この分画にN-ニトロソジフェニルアミンが溶出する。
- (7) 底質では、アルミナカラムでジフェニルアミンの溶出分画に、かなり黄色の着色物質が同時に溶出して、GC/MSの測定において、バックグラウンドが非常に高くなり、ベースの乱れも生じるため、フロリジルカートリッジカラムで着色物質を除去する。なお、カートリッジカラムはヘキサン10mlで洗浄した後、使用する。

(8) カラム温度は昇温せず、恒温で行ってもよい。恒温の場合、120℃で約4分程度の位置にジフェニルアミンのピークが出る。

- (9) 検出限界及び定量限界は「検出限界等の定め方について」(昭和63年5月27日)により算出する。なお、生物試料の検出限界は底質における求め方に準じる。

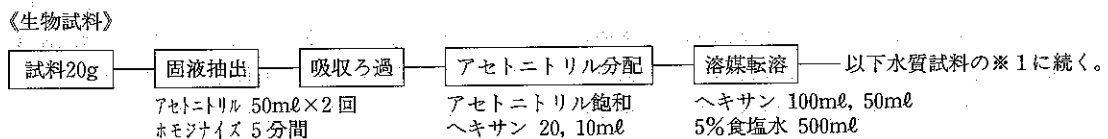
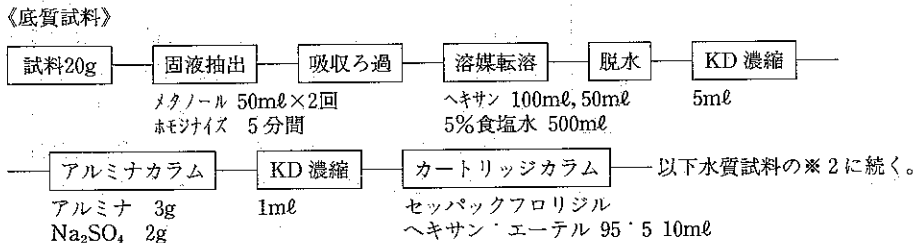
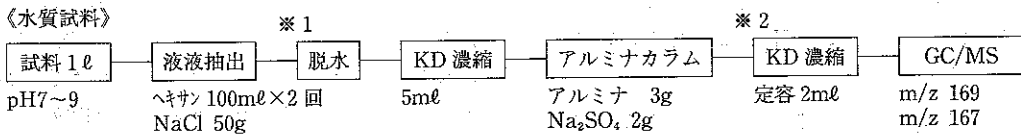
	水		質
試料濃度 ($\mu\text{g}/\ell$)	0.1	0.2	0.3
応答値 (\bar{X})	1,944	4,022	6,075
標準偏差 (σ_R)	103	151	207
検出力 (Dn)	0.0083	0.0120	0.0162
検出限界 ($\bar{D} \times 3$)		0.0363	
定量限界 ($\bar{D} \times 10$)		0.121	

	底質	生物
検出限界推定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.0	2.0
試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	10	10
分析値 (\bar{X})	7.79	7.20
標準偏差 (Sc)	0.52	0.64
検出限界 (DL)	1.63	2.01
95%信頼区間	1.04-3.59	1.29-4.42

3. 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕



〔分析法の検討〕

3-1 検量線

検量線の例を図1に示す。

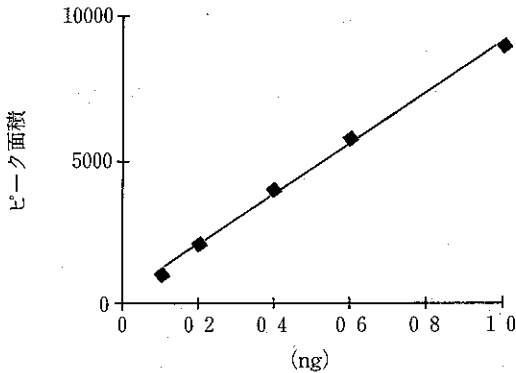


図1 ジフェニルアミンの検量線

3-2 低濃度添加回収実験

水質試料 1ℓ, 底質・生物試料 20g に標準品を添加し, 本分析法に従って行った添加回収実験の結果を示す。

試料	添加量(μg)	試料量	回数	回収率(%)	CV(%)
精製水	0.1	1ℓ	4	93.0	5.2
河川水	0.2	1ℓ	3	91.7	4.5
海水	0.2	1ℓ	3	92.8	3.6
底質	0.2	20g	7	77.9	6.7
生物	0.2	20g	7	72.0	8.9

3-3 分解性スクリーニング結果

常法に従い, HPLC 方法により測定した結果, ジフェニルアミンは水中では, pH に関係なく安定であった。

pH	放置時間	初期濃度 (μg/ml)	1時間 放置後 (%)	5日間放置後	
				暗所(%)	光照射(%)
5		2.5	99	99	—
7		2.5	103	102	99
9		2.5	102	102	—

3-4 前処理の検討

(1) 抽出溶媒

抽出溶媒として, ヘキサン, ベンゼン, ジクロロメタンの3種の溶媒を用い, 標準品 10μg を添加して抽出率を調べたところ, いずれの溶媒も 95% 以上の抽出率であった。そこで, 抽出溶媒は妨害が少なく扱い易いヘキサンを使用することにした。抽出時

に若干塩析効果が認められたので食塩を添加した。

なお, pH の変化で抽出率への影響はなかった。

(2) アルカリ分解

底質, 生物試料では, アルカリ分析—ヘキサン転溶について検討した。標準品 10μg 添加で, 底質では 90%, 生物では 80% 以上の回収率があり, 良好な結果であった。しかし, N-ニトロソジフェニルアミンが沸騰水浴中 30 分間のアルカリ分解の際に熱分解により, 全てジフェニルアミンに変換することが確認されたので(HPLC で確認), アルカリ分解は採用できなかった。

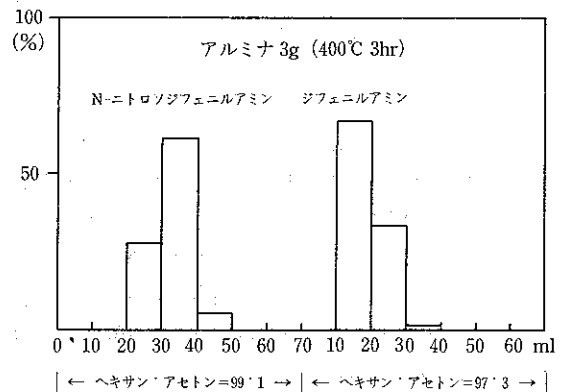


図2 アルミナカラムからの溶出パターン

3-5 クリーンアップの検討

N-ニトロソジフェニルアミンが GC の注入口で熱分解により, ジフェニルアミンとなり GC/MS ではジフェニルアミンとして測定される。そのため GC/MS 測定前に両物質を分離する必要がある。両物質の分離には, シリカゲル, フロリジル, アルミナを用いて検討した。シリカゲル, フロリジルでは完全な分離はできず, アルミナを用いることで両物質を分離することができた。なお, 底質では, 着色物質が同時に溶出するため, さらにセパックフロリジルで着色物質を除去した。底質のクリーンアップ操作を短縮するため, アルミナカラムの後の KD 濃縮を省き, アルミナカラムとカートリッジカラムの2段カラムにして行ったが, 溶出溶媒にアセトンが入っているため, 着色物質の除去はできず, KD 濃縮(KD 濃縮によりアセトンは除去される)を省略することはできなかった。図2にアルミナカラムから溶出パターンを示す。

3-6 マススペクトル

ジフェニルアミンのマススペクトルを図3に示す。

分子イオンのm/z 169がベースピークとなっており、

これをモニター質量数とし、m/z 167を確認イオンとした。

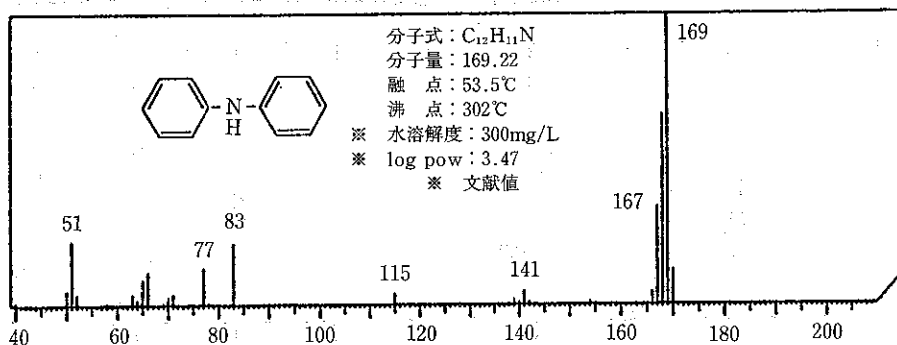


図3 ジフェニルアミンのマススペクトル

3-7 クロマトグラム

図4, 5に実試料のクロマトグラムを示す。

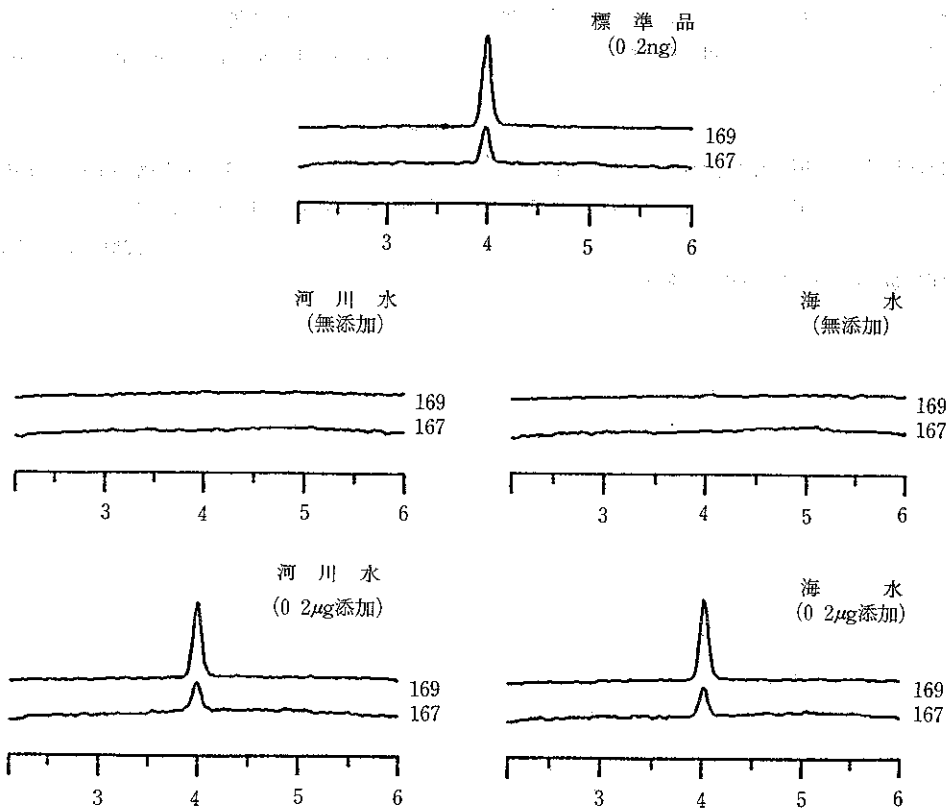


図4 河川水、海水のクロマトグラム

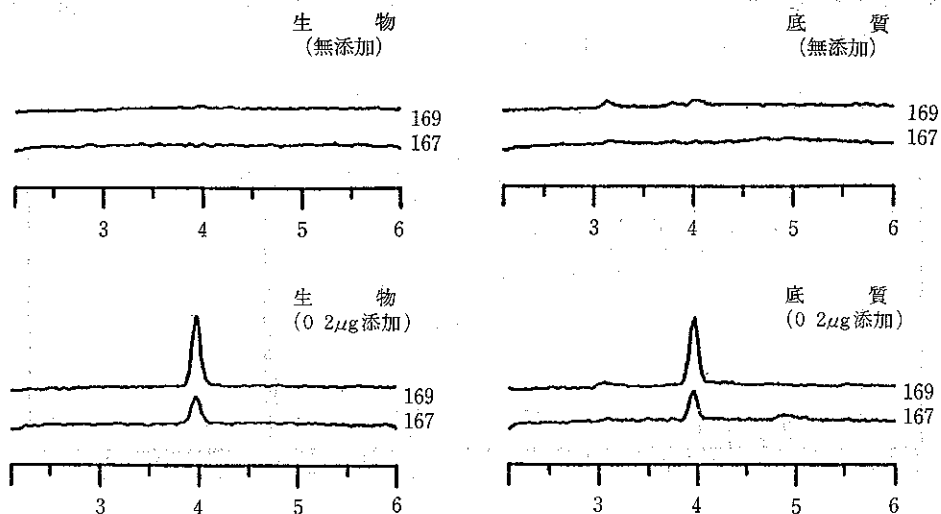


図5 共通底質、生物のクロマトグラム

3-8 試料の保存

試料を保存する場合は、pHを7~9に調整しておくこと。また、N-ニトロソジフェニルアミンが光分解によりジフェニルアミンになる可能性があるので暗所に保存する。

【評価】

本分析法により、環境中にppbオーダで存在するジフェニルアミンの定量を行うことが可能である。

参考文献

(1) 環境庁保健調査室：昭和62年度化学物質分析法

開発調査報告書（N-ニトロソジフェニルアミン；愛知県公害調査センター，2,6-ジ-*t*-ブチルフェノール；広島県環境センター）

(2) Federal Register, Vol 49, No 209 Oct 26, 81-88, 1984

あとがき

本分析法により、環境庁実施の平成2年度化学物質環境調査が全国24地点で行われた。

(公害検査課 水質検査係)