

(containing approx. 50% water) とリン酸(>85%)は和光純薬工業製、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩は関東化学社製を使用した。

## 1. カルボン酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成

①ギ酸-DNPH 誘導体 : 5 g の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩を 50 ml のギ酸に溶かす。純水 50 ml をこの溶液に加えた後 2 時間放置する。生成した淡黄色の沈殿をろ過して、残渣を純水 500 ml で洗浄する。沈殿をエタノールで再結晶させた後、真空乾燥した。

②酢酸, プロピオン酸, 酪酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成 : 5 g の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩と 5 mL の硫酸をそれぞれのカルボン酸 50 mL に溶かす。室温で 24 時間静置した後、沈殿をろ過し残渣を純水 500 mL で洗浄する。沈殿をエタノールで再結晶させた後、真空乾燥した。

## 2. カルボン酸捕集用 DNPH-cartridge の作成

50 g のシリカゲルを 500 mL の純水で 3 回、ついで 500 mL のメタノールで 2 回、最後に 500 mL のアセトニトリルで 2 回洗浄する。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 0.18 g とリン酸 0.5 mL をアセトニトリル 150 mL に溶かす。この溶液に洗浄したシリカゲル (50 g) を加え、よく攪拌する。40 °C に設定したロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、アセトニトリルを完全に除去する。DNPH 含浸シリカゲル 500 mg をポリエチレン製のカートリッジ (50 mm L × 8.8 mm i.d.) に充填し冷暗所 (4 °C) に保存した。

ギ酸標準ガスの発生と DNPH-cartridge による捕集 : ギ酸の標準ガスはガス発生器 (パーミエーター PD-1B, GASTEC 社製) を用いて発生させた。標準ガス発生器と DNPH-cartridge による捕集の概要を Fig. 1 に示す。

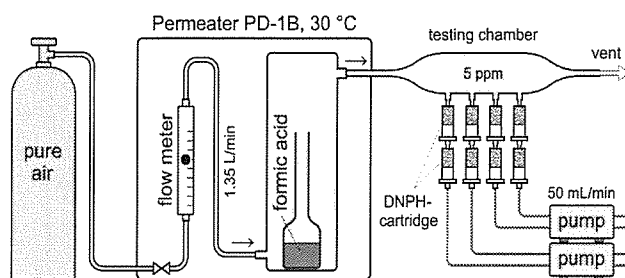


Fig. 1. Schematic diagram for formic acid gas generation and collection by DNPH cartridge.

ディフュージョンチューブ (3 mm i.d.) にギ酸を約 2 mL 加え、30.0 °C に設定したパーミエーターに入れるた後、純空気を一定の流速でパーミエーターに流す。ギ酸標準ガスの濃度は、ディフュージョンチューブの減少したギ酸の重量と導入した純空気の量から計算できる。例えば、ギ酸標準ガスは 30 °C の温度で 1.35 L/min の流速のとき 5 ppm の濃度である。

DNPH-cartridge の一端をチャンバーに接続し、もう一方をマスコントローラーを備えた定流量ポンプ (SP 208 Dual, GL サイエンス社製) に接続した。

## C. 研究結果および考察

### 1. カルボン酸-DNPH 誘導体

ギ酸標準ガスを飽和させた DNPH-cartridge を放置しておくと、DNPH の黄色い色が徐々に淡黄色に変化し、約 6 時間で全てが淡黄色に変わった。この DNPH-cartridge をアセトニトリルで溶出し、HPLC で分析すると DNPH のピークと異なった保持時間にピークが現れたこと

から、DNPH-cartridge 内でギ酸と DNPH が反応したことが推測される。ギ酸標準ガスを飽和させた DNPH-cartridge 内の反応を明らかにするため、DNPH-cartridge 内の DNPH と反応物質の経時変化を測定した (Fig. 2)。

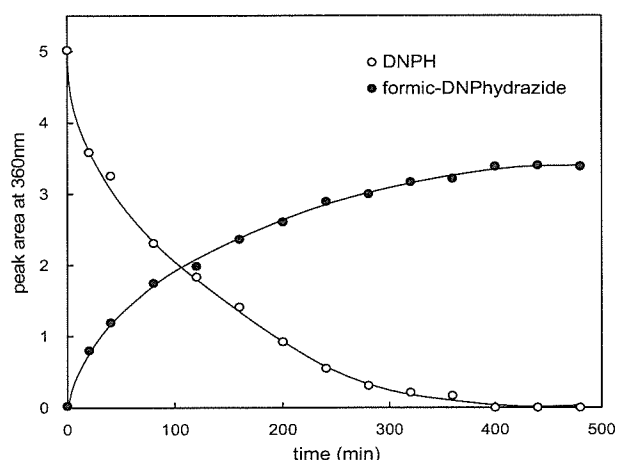


Fig. 2. The reaction of excess formic acid and DNPH with time ( $\lambda=360$  nm).

HPLC の検出波長は 360 nm である。DNPH の減少に伴い未知物が増加した。反応時間と共にこのピークの物質は増加し、最終的に DNPH は消滅した (Fig. 2)。酢酸、プロピオン酸、酪酸も同様な挙動を示したが、炭素数の増加に伴い反応時間も長くなった。カルボン酸と DNPH の反応としては、まずヒドラゾン誘導体が生成し、ケト-エノール互変異性化によりヒドラジド誘導体が生成したことが推測できる。

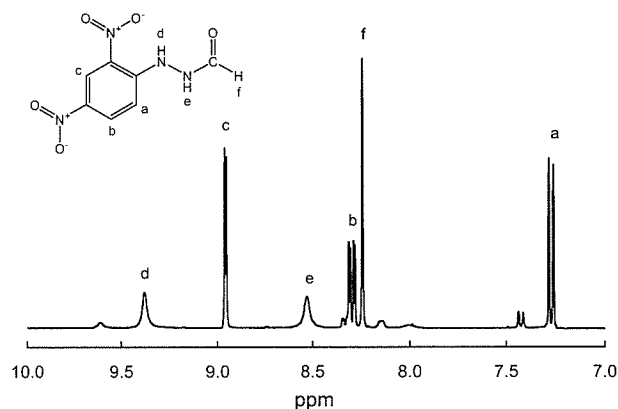
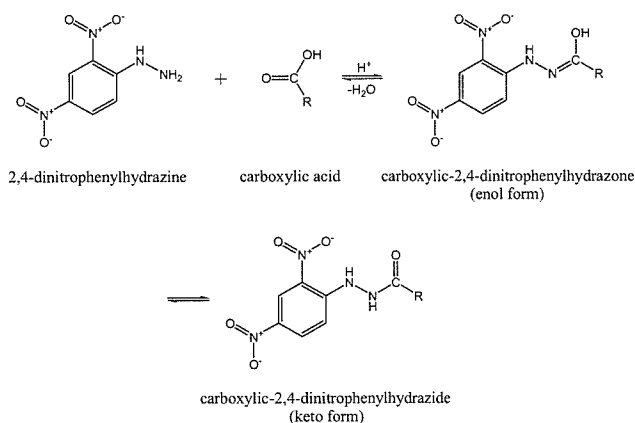


Fig. 3.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the DNPH derivative synthesized with formic acid.

DNPH-cartridge から溶出した物質と本実験で合成した誘導体を 2 種類のカラム (C18 and RP-Amide C16) で HPLC 分析すると、保持時間が同一であったことから、これらの物質は同じ誘導体であることが確認された。

## 2. カルボン酸-DNPH 誘導体

本実験で合成したカルボン酸-DNPH 誘導体を NMR で測定した。ギ酸-DNPH 誘導体の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを Fig. 3 に示す。また、バカボン酸-DNPH の  $^1\text{H-NMR}$  データは以下の通りである。

formic-DNPH:  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$ ,  $\delta(\text{ppm})$ : 7.25 (d 1H,  $J=9.6$ , a); 8.28 (dd 1H,  $J=2.5, 9.4$ , b); 8.94 (d 1H,  $J=2.8$ , c); 9.36 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 8.23 (s 1H, f).  
 acetic-DNPH:  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$ ,  $\delta(\text{ppm})$ : 7.25(d 1H,  $J=9.2$ , a); 8.25 (dd 1H,  $J=2.75, 9.6$ , b); 8.92 (d 1H,  $J=2.8$ , c); 9.37 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  
 propionic-DNPhydrazide  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$ ,  $\delta(\text{ppm})$ : 7.22 (d 1H,  $J=9.6$ , a); 8.23 (dd 1H,  $J=2.52, 9.39$ , b); 8.91 (d 1H,  $J=2.29$ , c); 9.37 (s 1H, d); 8.48 (s 1H, e); 2.30 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1.13 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  
 butyric-DNPhydrazide  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$ ,  $\delta(\text{ppm})$ : 7.21 (d 1H,  $J=9.15$ , a); 8.24 (dd 1H,  $J=2.75, 9.62$ , b);

8.91 (d 1H, J=2.75, c); 9.39 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 2.27 (m, 2H, J=7.56, CH<sub>2</sub>); 1.66 (t, 2H, J=7.42, CH<sub>2</sub>). 0.964 (t, 3H, J=7.327, CH<sub>3</sub>)

DSC 分析の結果, カルボン酸-DNPH 誘導体は熱安定性に優れていることが明らかになった。C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub> の DNPH 誘導体の融点を Table1 に示す。ヒドラジド誘導体は対応するヒドラゾン誘導体より 32~50°C 融点が高かった。

カルボン酸-DNPH 誘導体の紫外可視吸収スペクトルを Fig4 に示す。誘導体は全て, 20μmol/L のアセトニトリル溶液である。Fig4 には参考として, DNPH の吸収スペクトルも示してある。カルボン酸-DNPH 誘導体のスペクトルは, 類似した吸収を示した。特に酢酸, プロピオン酸, 酪酸ヒドラジド誘導体は 333~334nm 付近に極大吸収波長を示し, モル吸光係数(1.42 × 10<sup>4</sup> · 1.44 × 10<sup>4</sup> L/mol/cm)も同程度であった (Table 1)。

Table 1. Maximum absorption wavelengths ( $\lambda_{\max}$ ) and molar absorption coefficients ( $\epsilon$ ) of C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> carboxylic acid and aldehyde-DNPH derivatives. Melting points of aldehyde-2,4-DNPhydrazones are the literature values.

	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mol/cm)	mp (°C)
formic-DNPhyrazide	331	1.36 × 10 <sup>4</sup>	185.7
acetic-DNPhyrazide	333	1.42 × 10 <sup>4</sup>	201.5
Propionic-DNPhyrazide	334	1.44 × 10 <sup>4</sup>	192.0
butyric-DNPhyrazide	334	1.44 × 10 <sup>4</sup>	167.1
DNPhyrazine	351	1.55 × 10 <sup>4</sup>	ca. 200 <sup>30)</sup>
formaldehyde-DNPhyrazone	349	1.91 × 10 <sup>4</sup>	153-156 <sup>31)</sup>
acetaldehyde-DNPhyrazone	359	2.10 × 10 <sup>4</sup>	165-168 <sup>31)</sup>

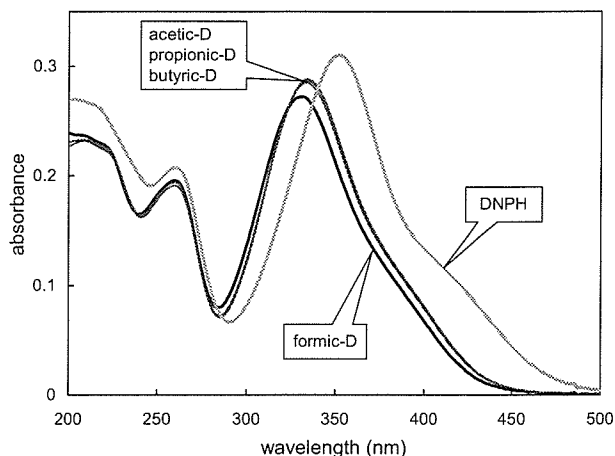


Fig. 4. UV-visible absorption spectra of carboxylic- DNPhyrazide derivatives in acetonitrile solution (20 μmol/L).

### 3. カルボン酸 DNPH 誘導体の分離

C18 と RP-Amide-C16 カラムを用いて, 蟻酸, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸-DNPH 誘導体の分析条件を検討した。Fig.5 に RP-Amide-C16 カラムを用いたときの

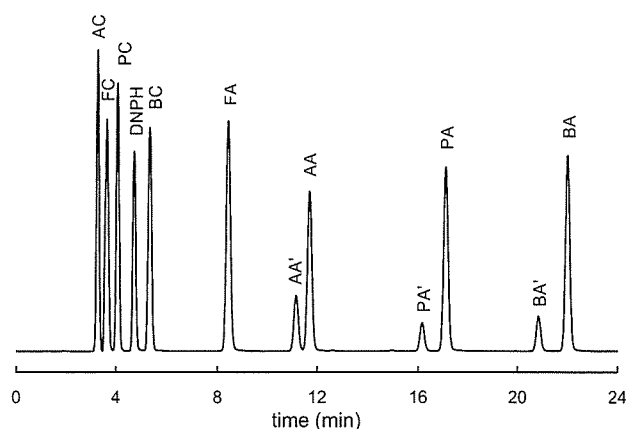


Fig. 5. Chromatographic profile of C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> carboxylic- DNPhyrazides and aldehyde-DNPhydrazones on RP-Amide C16 column (100 μmol/L). A prime sign indicates the Z-isomer peak and the other peaks without prime sign are the E-isomers.<sup>32</sup>

FC: formic-DNPhyrazide, AC: acetic-DNPhyrazide, PC: propionic- DNPhyrazide, BC: butyric-DNPhyrazide, FA: formaldehyde- DNPhyrazone, AA: acetaldehyde-DNPhyrazone, PA: propionalde

C1~C4 のヒドラジド, ヒドラゾン誘導体のクロマトグラムを示す。DNPH 誘導体標準溶液の濃度は 100 μmol/L であり,

0.1%のリン酸を含んでいる。アルデヒド-DNPH 誘導体の場合、小さなピークと大きなピークの2つのピークが検出された。これらは、それぞれ幾何異性体 (Z/E) である<sup>32)</sup>。アルデヒド-DNPH 誘導体の溶液に酸が含まれないと E-異性体しか存在しないが、求核試薬であるリン酸が存在すると異性化反応が起こり Z-異性体が生成する<sup>33,34)</sup>。DNPH-cartridge は触媒としてリン酸を含有している。したがって、必然的に抽出溶液に酸が存在し、異性化反応が起こる。これに対し標準溶液には酸が含まれていないので異性化反応は起こらない。試料溶液と標準溶液の異性体比を同一にするために、標準溶液にも 0.1%のリン酸を添加するべきである。Fig. 4 において、ギ酸-、酢酸-、プロピオン酸-DNPH 誘導体のピークは DNPH のピークの前に検出され、酪酸-DNPH 誘導体は後に検出された。分離カラムに C18 を使用した場合、ギ酸-DNPH 誘導体と酢酸-DNPH 誘導体のピークが重なり合い、アセトアルデヒド-DNPH 誘導体の Z-異性体と E-異性体の分離が不完全であった。RP-Amide-C16 などのアミドカラムは高純度シリカをベースにしたアルキルアミド逆相カラムである。アルキルアミド基は、ODS のアルキル基による疎水性親和力に比べ異なった選択性を持つ<sup>35)</sup>。アミドカラムのアルキル基とアルキルアミド基の両方が存在することにより、アルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の極性基とアミド基間の相互作用、およびアルキル基による疎水性親和力の2つの保持機構が存在する。それゆえ、アミドカラムは ODS と異なった特有の選択性を持ち、従来、分離が困難であったアセトアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの異性体の完全分離が可能になったと思われる。C<sub>2</sub> 以上のアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの場

合は、ODS でも必然的に幾何異性体を分離した。そして、分離させずにシングルピークにすることは不可能であった。ヒドラジド誘導体の場合、アミドカラムを用いることで、C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub> のカルボン酸-DNPH 誘導体を完全に分離することができた。

#### 4. DNPH-cartridge を用いたギ酸の捕集と誘導体化

2つの DNPH-cartridge を直列に連結し、ギ酸標準ガス (5 ppm) を 50 ml/min の流速で 30 分間通気した。2段目の DNPH-cartridge は1段目を通過したギ酸を捕集するためのバックアップである。捕集後の DNPH-cartridge は1~10時間恒温槽内で直ちに加熱された。その後、アセトニトリル 5 mL で DNPH 誘導体を抽出し、HPLC で分析した。各温度におけるギ酸誘導体の経時変化を Fig.6 に示す。全ての実験条件下で、2段目の DNPH-cartridge にギ酸誘導体が検出されなかったことから、1段目で全てのギ酸が捕集されたことが確認された。ガス状のギ酸は DNPH cartridge に非常に速い速度で物理的に吸着する。その後、DNPH と徐々に反応し誘導体が生成したことが推測される。反応速度は 20 °C では非常に遅いが、温度の上昇によって劇的に速くなった。

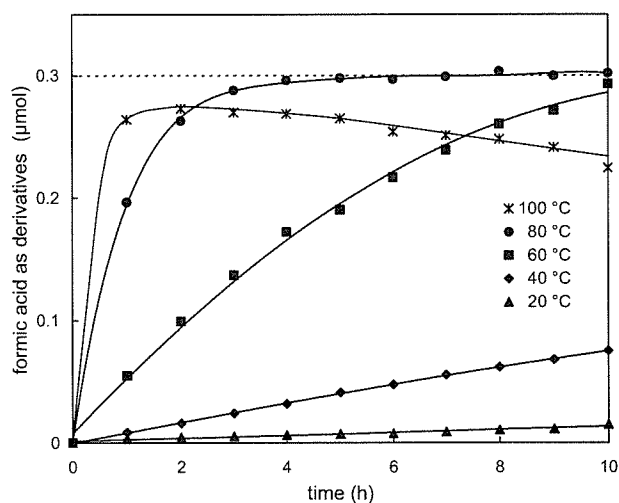


Fig. 6. Reaction of formic acid and DNPH in the DNPH-cartridge at various temperatures.

全ての実験で 100 °C の時が最も反応速度が速かった。しかし、回収率は 100 % (0.3  $\mu\text{mol}$ ) に達せず、2 時間を過ぎてから減少し始め、DNPH 誘導体の熱分解が観測された。100 °C に加熱したとき、10 時間で 14 % までに DNPH のピーク面積も減少し、DNPH の分解成分 (1,3-ジニトロベンゼン, 2,4-ジニトロアニリン) が検出された。前述したようにヒドラジド誘導体の熱安定性は非常に高い。しかし、DNPH が熱分解することでギ酸との反応性が低下したことが考えられる。80 °C で 10 時間加熱している間、DNPH のピーク面積は 76 % まで減少した。また、20~60 °C の加熱では、DNPH の分解は認められなかった。以上の結果から、DNPH-cartridge 中でのヒドラジド誘導体化反応の加熱条件は 80 °C 5 時間が最も適していることが明らかになった。

カルボン酸、アルデヒド、ケトン類と DNPH の反応には酸触媒が必要である。しかし、酸濃度が高すぎると、カルボン酸が DNPH-cartridge を通過してしまう恐れがある。そのため、最適な酸の量を検討した。0.1~10 % v/w のリン酸を含む DNPH 含浸シリカゲルを作成し、500 mg をカートリッジに充填した。バックアップとして 1 % v/w のリン酸を含む DNPH cartridge を 2 段目に接続し、5 ppm のギ酸標準ガスを 50 ml/min の流速で 30 分間通気した。捕集後直ちに DNPH cartridge を 80 °C で 5 時間加熱し、5 mL のアセトニトリルで溶出した後 HPLC で分析した。リン酸添加量によるヒドラジド誘導体の回収率の変化を Fig. 7 に示す。リン酸濃度が低い時と高いときにギ酸の回収率が低い。リン酸濃度が高すぎると、ギ酸等の酸性ガスは DNPH-cartridge に吸着し難いことが予測されるが、0.1~10 % v/w のリン酸濃度範囲で 2 段目の DNPH-cartridge にギ酸が検出されなかったことから、すべての実験条件で 1 段目

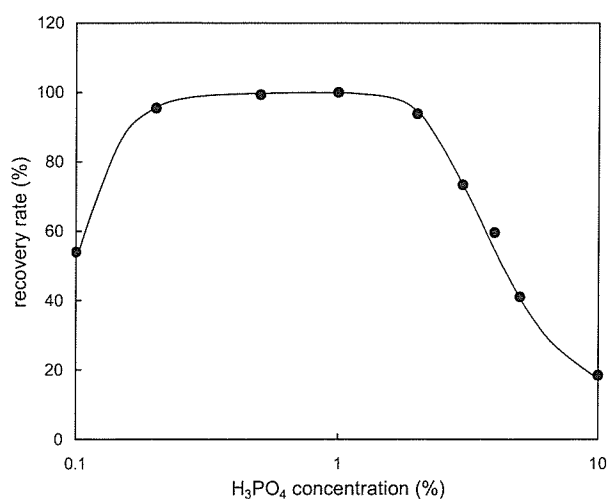


Fig. 7. Influence of phosphoric acid concentration on formation of hydrazone derivative.

の DNPH cartridge は完全にギ酸を捕集したことが確認された。従って、Fig. 7 の回収率は捕集効率に依存していない。リン酸濃度が 0.2~1 % のときヒドラジドへの誘導体化は完全に進行した。DNPH によるアルデヒド、ケトン類のヒドラゾン誘導体化反応は酸性の方が進行しやすいので、同時分析を考慮すると、リン酸濃度は 1 % v/w が最も適していると考えられる。これらの結果から、カルボン酸、アルデヒド、ケトン類の同時分析には、1 % v/w のリン酸濃度の DNPH 含浸シリカゲルを充填した DNPH-cartridge を使用し、捕集後カートリッジを 80 °C で 5 時間加熱することが最も適した条件である。

## 5. 室内空気の測定

DNPH cartridge に室内空気を 50 mL/min の流速で 24 時間通気した。捕集は平行して 2 系統で行った。捕集後、カートリッジを 20 °C または 80 °C で 5 時間加熱してから、前述の方法で DNPH 誘導体を分析した。加熱条件が 20 °C と 80 °C のときのクロマトグラムを Fig. 8 に示す。2 段目の DNPH-cartridge にはバックグラウンドレベルの DNPH 誘導体しか検出さ

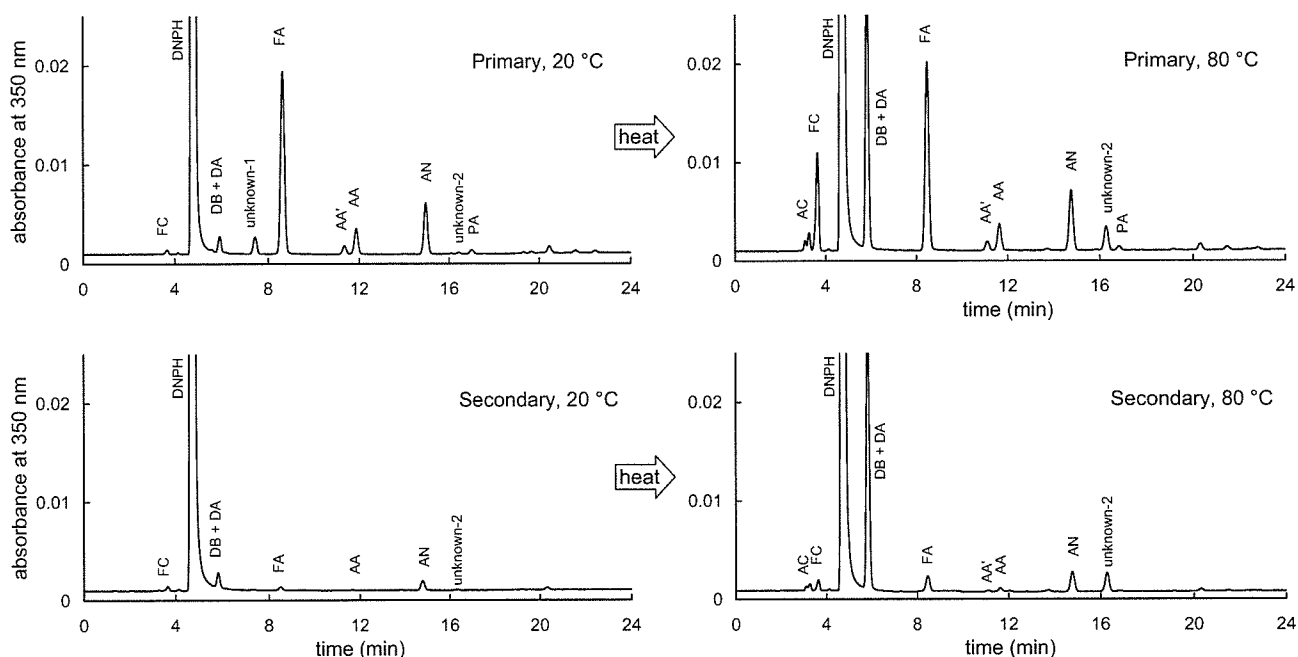


Figure 6. Chromatographic profiles of DNPH derivatives from air sample measured with a heat treatment of 80 °C and 20 °C.

FC: formic-DNPhydrazide, AC: acetic-DNPhydrazide, PC: propionic-DNPhydrazide, FA: formaldehyde-DNPhydrazone, AA: acetaldehyde-DNPhydrazone, PA: propionaldehyde-DNPhydrazone, BA: butyraldehyde-DNPhydrazone, AN: acetone, DB:

れなかったことから、空気中のカルボン酸、アルデヒド、ケトン類は完全に 1 段目の DNPH-cartridge に捕集されたことが考えられる。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒドなどのヒドラゾン誘導体は 20 °C と 80 °C の時でほとんど変化していないことから、20 °C で反応が終了していることがわかる。一方、ギ酸-ヒドラジド誘導体は 20 °C の時は、ほとんど検出されなかったが、80 °C のときは大きなピークが検出された。Fig. 6 のクロマトグラムでいくつかの未知物質のピークが検出されている。捕集後直後の加熱処理をしていないサンプルでは“unknown-1”のピークがしばしば現れる。捕集後長時間置いてから分析した場合“unknown-2”のピークが検出された。このことから、unknown-1 は時間により unknown-2 に変化したことが推測される。Unknown-1 の物質は DNPH とオゾンが反応して生成した 2,4-ジニトロフェニルアジドが考えられ

る<sup>36)</sup>。この物質は熱に不安定であり、加熱することでより安定なニトロベンゾフラザン-3-オキサイド(unknown-2)に変化<sup>37,38)</sup>したことが推測される。

#### D. 結論

カルボン酸は DNPH と反応しないとされていたが、我々は DNPH-cartridge を用いることで、C1~C4 のカルボン酸が DNPH と反応し安定なヒドラジド誘導体を生成することを発見した。これらのヒドラジド誘導体は熱安定性に優れ、極大吸収波長がアルデヒド-ヒドラゾン誘導体に近く、モル吸光係数も比較的大きいので、ヒドラゾン誘導体と同時に HPLC 分析することが可能である。RP-Amide C16 を分離カラムに用い、350 nm の検出波長で分析すれば、カルボン酸、アルデヒド、ケトン類の DNPH 誘導体を同時に測定することができる。カルボン酸と DNPH の反応は遅いが、DNPH-cartridge を空気試料の捕集

管として用い、捕集後にカートリッジを80°Cで5時間加熱することで、ギ酸を全てヒドラゾン誘導体にすることが可能であった。

#### E. 文献

- 1) Mader, P.P.; Cann, G.; Palmer, L. *Plant Physiol.* 1955, 30, 318.
- 2) Kumar, N.; Kulshrestha, U.C.; Khare, P.; Saxena, A.; Kumari, K.M.; Srivastava, S.S. *Atmos. Environ.* 1996, 30, 3545-3550.
- 3) Gronberg, L.; Shen, Y.; Jonsson, J.A. *J. Chromatogr. A* 1993, 655, 207-215.
- 4) Kawamura, K.; Ng, L.L.; Kaplan, I.R. *Environ. Sci. Technol.* 1985, 19, 1082-1086.
- 5) Allen, A.G., Miguel, A.H. *Atmos. Environ.* 1995, 29, 3519-3526.
- 6) Hekmat, M., Smith, R.G., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1991, 52, 332-335.
- 7) Grosjean, D.; Van-Neste, A.; Parmar, S.S. *J. Liq. Chromatogr.* 1989, 12, 3007-3017.
- 8) Lawrence, J.E.; Koutrakis, P. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 957-964.
- 9) Souza, S.R.; Vasconcellos, P.C.; Carvalho, L.R.F. *Atmos. Environ.* 1999, 33, 2563-2574.
- 10) Johnson, B.J.; Huang, S.C.; Wong, A.; Yao, L. *Microchem. J.* 1994, 49, 79-84.
- 11) Tanaka, K.; Fritz, J.S. *J. Chromatogr.* 1986, 361, 151-160.
- 12) Vainiotalo, S.; Pfaffli, P.; Zitting, A. *J. Chromatogr.* 1983, 258, 207-221.
- 13) Surowiec, K.; Dasgupta, P.K. *J. Microcolumn Sep.* 1998, 10, 265-271.
- 14) Ryhl-Svendsen, M.; Glastrup, J. *Atmos. Environ.* 2002, 36, 3909-3916.
- 15) Kobayashi, K.; Tanaka, M.; Kawai, S. *J. Chromatogr.* 1980, 187, 413-417.
- 16) Magin, D.F. *J. Chromatogr.* 1979, 178, 219-227.
- 17) Swarin, S.J.; Lipari, F. *J. Liq. Chromatogr.* 1983, 6, 425-444.
- 18) Schmied, W.; Przewosnik, M.; Baechmann, K. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 1989, 335, 464-468.
- 19) Bueldt, A.; Lindahl, R.; Levin, J.O.; Karst, U. *J. Environ. Monit.* 1999, 1, 39-43.
- 20) Cecinato, A.; Di-Palo, V.; Mabilia, R.; Possanzini, M. *Chromatographia* 2001, 54, 263-269.
- 21) Grosjean, D. *Environ. Sci. Technol.* 1982, 16, 254-262.
- 22) Kuwata, K.; Uebori, M.; Yamasaki, H.; Kuge, Y.; Kiso, Y. *Anal. Chem.* 1983, 55, 2013-2016.
- 23) Levin, J. O.; Andersson, K.; Lindahl, R.; Nilsson, C. A. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1032-1035.
- 24) Allen, C. F. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1930, 52, 2955-2959.
- 25) Brady, O. L. *J. Chem. Soc.* 1931, 756-759.
- 26) Bohlmann, F. *Chem. Ber.* 1951, 84, 490-504.
- 27) Rappoport, Z.; Sheradsky, T. *J. Chem. Soc.* 1968, 277-291.
- 28) Peters, R.; Hellenbrand, J.; Mengerink, Y.; Van der Wal, S.j. *J. Chromatogr. A* 2004, 1031, 35-50.
- 29) Miwa, H. *J. Chromatogr. A*

- 2000, 881, 365-385.
- 30) Budavari, S.; O'Neil, M.; Smith, A.; Heckelman, P.; Kinneary, J. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Chapman and Hall, London, UK, 1996; Pp. 2576.
- 31) The 2003-2004 Aldrich Handbook of Fine Chemicals.
- 32) Uchiyama, S.; Ando, M.; Aoyagi, S. J. Chromatogr. A 2003, 996, 95-102.
- 33) Behforouz, M.; Bolan, J. L.; Flynt, M. S. J. Org. Chem. 1985, 50, 1186-1189.
- 34) Binding, N.; Müller, W.; Witting, U. Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, 356, 315-319.
- 35) Kallury, K.; Shieh, P.; Paschal, R.; Cooke, N. Supelco Rep. 1998, 17, 5-7.
- 36) Karst, U.; Binding, N.; Cammann, K.; Witting, U. Fresenius' J. Anal. Chem. 1993, 345, 48-52.
- 37) Dyall, L.K.; Kemp J.E. J. Chem. Soc. B 1968, 976-979.
- 38) Dyall, L.K.; Wah W.M. Aust. J. Chem. 1985, 38, 1045-1059.



## IV-1. 2. 放散試験のための分析方法

### iv) フタルアルデヒドの分析

分担研究者 大坪 泰文 千葉大学 工学部 教授  
内山 茂久 千葉大学 工学部 非常勤講師

協力研究者 松島江里香 国立医薬品食品衛生研究所

環境衛生化学部 協力研究員

**研究要旨** フタルアルデヒドはグルタルアルデヒドの代替消毒剤として使用され始めているが、現在のところ分析方法は無い。本研究では空気中のフタルアルデヒドを2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを含浸させたシリカゲルを捕集剤とするカートリッジ（DNPH-cartridge）で捕集し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分析する方法を開発した。フタルアルデヒドはその分子構造から3つの位置異性体（オルト、イソ、テレ）が存在する。イソとテレフタルアルデヒドの場合、DNPHが過剰の状態では合成すると、主要な生成物はビス誘導体であり、フタルアルデヒドが過剰な状態で合成すると、主要な生成物はモノ誘導体であった。一方、オルトフタルアルデヒドの場合は、どのような条件でもビス誘導体だけが生成した。DNPH-cartridgeに空気試料を通気するとオルトフタルアルデヒドは完全に吸着するが、誘導体化反応は比較的遅いため、抽出溶液中には未反応のオルトフタルアルデヒドが存在した。そして、未反応のオルトフタルアルデヒドは抽出溶液中で反応が進行した。また、抽出直後はモノ誘導体とビス誘導体が共存するが、数時間で全てビス誘導体へ変わった。モノ誘導体からビス誘導体への変化はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチルなどの非プロトン性極性溶媒の場合に速く、メタノールなどのプロトン性極性溶媒の場合は遅かった。例えば、アセトニトリルを抽出溶媒にした場合、4時間で全てビス誘導体に変化した。DNPH-cartridgeを用いて大気中のオルトフタルアルデヒドをHPLCで分析するとき、ビス誘導体として定量することができる

#### A. 研究目的

医療機関において内視鏡等の医療器具の殺菌消毒剤として広く使用されているグルタルアルデヒドは、皮膚、気道等に対する刺激性等を有する物質であり、実際に医療機関でこれを取り扱う労働者に皮膚炎等の健康障害が発生している。このため、最近、オルトフタルアルデヒドが代替として使用されるようになってきた。しかし、オ

ルトフタルアルデヒドも皮膚や呼吸器系に刺激を与えるという報告<sup>1)</sup>もあり、安全性は確認されていない。また、分析方法も開発されていない。

空気中のグルタルアルデヒドに関しては、様々な分析方法が報告されている。最も多いのは、固体捕集-誘導体化法<sup>2-7)</sup>である。捕集方法としてはポンプを用いたアクティブサンプリング法、分子の自然拡散

を利用した拡散捕集がある。捕集後、グルタルアルデヒドの誘導体は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>3,4)</sup>あるいはガスクロマトグラフィー (GC)<sup>2,5,7)</sup>で分析される。

アルデヒド、ケトン類の分析として最も広く利用されているのは、アミノ基 (NH<sub>2</sub>)を持つ化合物のカルボニル (C=O)炭素への求核付加反応、及び安定なシッフ塩基 (C=N)生成反応である。この誘導体化法は GC や HPLC において非常に有用であり、*O*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン<sup>7)</sup>、*O*-ベンジルヒドロキシルアミン<sup>8)</sup>、2-ジフェニルアセチル-1,3-インダンジオン-1-ヒドラゾン<sup>9)</sup>、5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホヒドラジン (ダンシルヒドラジン)<sup>10)</sup>、*N*-メチル-4-ヒドラジノ-7-ニトロベンゾフラザン<sup>11)</sup>、ペンタフルオロフェニルヒドラジン<sup>12-14)</sup>、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH)<sup>15-17)</sup>などの多くの誘導体化試薬が使用されている。特に、DNPH とアルデヒド、ケトン類の反応は 80 年近く前から研究されてきた。アルデヒド、ケトン類の DNPH 誘導体は 360 nm 付近に極大吸収波長をもつため、UV 検出器を備えた HPLC で分析されることが多い<sup>18,19)</sup>。近年、DNPH-HPLC 法は大気中のカルボニル化合物の分析方法として最も広く利用され、アクティブサンプリング<sup>20)</sup>、拡散サンプリング<sup>21)</sup>に応用されている。しかし、OPA などのようなジアルデヒド類の DNPH 誘導体に関する情報は皆無である。ジアルデヒドと DNPH が反応するとき、生成物がモノ誘導体なのか、ビス誘導体なのか、あるいはその混合物なのかは非常に重要なことである。誘導体の構造が分からなければ、定量することができない。そこで、本研究では OPA と DNPH の反応メカニズムを明らかにし、空気中の OPA 濃度を測定する方法を開発した。

## B. 研究方法

装置：HPLC は 2 台の送液ポンプ LC-10ADvp, オートサンプラー SIL-10Advp, 紫外検出器 SPD-10Avp, フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp を備えた LC-10 (島津製作所製) を使用した。分離カラムは Ascentis RP-Amide (250 mmL × 4.6 mm i.d. 5 μm particle size, スペルコ社製) を用いた。送液は移動相 A: アセトニトリル/水, 40/60 v/v, 移動相 B: アセトニトリル/水, 75/25 v/v を用い、グラジエント分析の場合は以下のプログラムで 2 液グラジエント分析を行った。

Time (min)	0	8	30	60
A (%)	100	100	0	0

流速は 1.5 mL/min であった。アイソクラティック分析の場合は、アセトニトリル/水, 70/30 v/v の移動相を用い、流速は 2.5 mL/min であった。フタルアルデヒド-DNPH 誘導体の構造解析にはフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR Spectrum One, パーキンエルマー社製) を使用した。

試薬：HPLC および試薬の調整には Milli-Q Water System を使用した。アセトニトリルは HPLC grade (和光純薬工業製)、オルトフタルアルデヒド (OPA, 97%), イソフタルアルデヒド (IPA, 97%), テレフタルアルデヒド (TPA, 99%), 酪酸 (99%), ホルムアルデヒド (37% 水溶液), アセトアルデヒド (99.5%), プロピオンアルデヒド (97%), ブチルアルデヒド (99.5%), シリカゲル (Davisil™ grade 635, 60-100 mesh) はアルドリッチ社製を使用した。その他、DNPH

(containing approx. 50% water), メタノール, ジメチルスルホキシド, 酢酸エチル, リン酸(>85%)は和光純薬工業製, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩(>85%)は関東化学社製を使用した。

### 1. フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成

DNPH 溶液の調整: 5 g の DNPH 塩酸塩を濃硫酸 50 mL に溶かした後, エタノール/水, 250/70 v/v の混合溶液を加えよく攪拌する。

### 2. DNPH が過剰な条件での合成

OPA, IPA, TPA をそれぞれ 0.67 g 秤量し, エタノール 100 mL に溶かす。この溶液に DNPH 溶液を 350 mL 加えよく攪拌する。沈殿をろ過した後, 純水 3000 mL, メタノール 500 mL, 最後にアセトニトリル 500 mL で洗浄する。残渣をロータリーエバポレーターで恒量になるまで減圧乾燥した。

### 3. フタルアルデヒドが過剰な条件での合成

OPA, IPA, TPA をそれぞれ 2.64 g 秤量し, エタノール 200 mL に溶かす。この溶液に DNPH 溶液を 87 mL 加えよく攪拌する。沈殿をろ過した後, 純水 2000 mL, メタノール 500 mL, 最後にアセトニトリル 500 mL で洗浄する。残渣をロータリーエバポレーターで恒量になるまで減圧乾燥した。

フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体は有機溶媒に対して, 溶解度が非常に小さい。アセトニトリルの場合, OPA-DNPH 誘導体の飽和溶液は約 6 mg/L である。

### 4. OPA 捕集用 DNPH-cartridge の作製

50 g のシリカゲルを 500 mL の純水で 3 回, ついで 500 mL のメタノールで 2 回, 最後に 500 mL のアセトニトリルで 2 回洗浄する。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 0.25 g とリン酸 1 mL をアセトニトリル 50 mL に溶かす。この溶液に洗浄したシリカゲル (50 g) を加え, よく攪拌する。40°C に設定したロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ, アセトニトリルを完全に除去。DNPH 含浸シリカゲル 500 mg をレゾリアンチューブ (1 mL, スペルコ社製) に充填し冷暗所 (4 °C) に保存した。

### ギ酸標準ガスの発生と DNPH-cartridge による捕集

ギ酸の標準ガスはガス発生器 (パーミエーター PD-1B, GASTEC 社製) を用いて発生させた。ディフージョンチューブ (3 mm i.d.) に OPA を約 2 mL 加え, 50.0 °C に設定したパーミエーターに入れるた後, 純空気を一定の流速でパーミエーターに流す。ギ酸標準ガスの濃度は, ディフージョンチューブの減少したギ酸の重量と導入した純空気の量から計算できる。例えば, ギ酸標準ガスは 50°C の温度で 200 mL/min の流速のとき 0.3 mg/m<sup>3</sup> の濃度である。

DNPH-cartridge の一端をチャンバーに接続し, もう一方をマスコントローラーを備えた定流量ポンプ (SP 208 Dual, GL サイエンス社製) に接続した。DNPH-cartridge に OPA 標準ガスを 50 mL/min の流速で 5 時間通気した後, カートリッジから DNPH 誘導体をアセトニトリル 5 mL で抽出した。抽出溶液の 20 µL を分取し, HPLC に導入した。

### C. 研究結果および考察

#### 1. フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の特性

オルト, イソ, テレフタルアルデヒド-

2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体を各 2 mg 秤量し, 1000 mL のジメチルスルホキシドに溶かした後, HPLC でアイソクラティック分析を行った。Fig.1 に DNPH 過剰 ( $\times 4$  mol) の条件で合成したクロマトグラムとフタルアルデヒド過剰 ( $\times 4$  mol) の条件で合成したクロマトグラムを示す。

図中でアルデヒドが過剰の条件で合成した誘導体のクロマトグラムは“-A”で, DNPH が過剰の条件で合成した誘導体のクロマトグラムは“-D”で表示した。いずれの条件でも OPA-DNPH 誘導体は 1 つのピークしか現れなかったが, IPA-DNPH と TPA-DNPH の場合は 2 つのピークが検出された。保持時間の早いピークにおいて, IPA-A と TPA-A はそれぞれ対応する IPA-D と TPA-D よりピーク面積が大きい。一方, 保持時間の遅いほうのピークでは, IPA-D と TPA-D はそれぞれ対応する IPA-A と TPA-A よりピーク面積が大きかった。フタルアルデヒドのようなジアルデヒドは, モノ誘導体とビス誘導体, あるいは両方の誘導体を生成する可能性がある。保持時間の早いピークはモノ誘導体であり, 遅いピークはビス誘導体であると推測される。OPA-A, IPA-A, TPA-A の FTIR スペクトルを Fig. 2 に示す。IPA-A と TPA-A は  $1691\text{ cm}^{-1}$  にカルボニル ( $>\text{C}=\text{O}$ ) の伸縮振動が検出された。したがって, モノ誘導体を含むことがわかる。一方, OPA-A の場合カルボニルの伸縮振動が検出されなかったことからビス誘導体のみで構成されることが推測される。これらの結果から, フタルアルデヒドが過剰の条件では, IPA, TPA は主にモノ誘導体を生成し, 逆に DNPH が過剰のときは, IPA, TPA は主にビス誘導体を生成するが, OPA はどちらの条件でもビス誘導体のみを生成することが明らかになった。OPA-DNPH, IPA-DNPH, TPA-DNPH 誘導体(各  $5\text{ }\mu\text{mol/L}$  ジメチルス

ルホキシド溶液)の紫外吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。

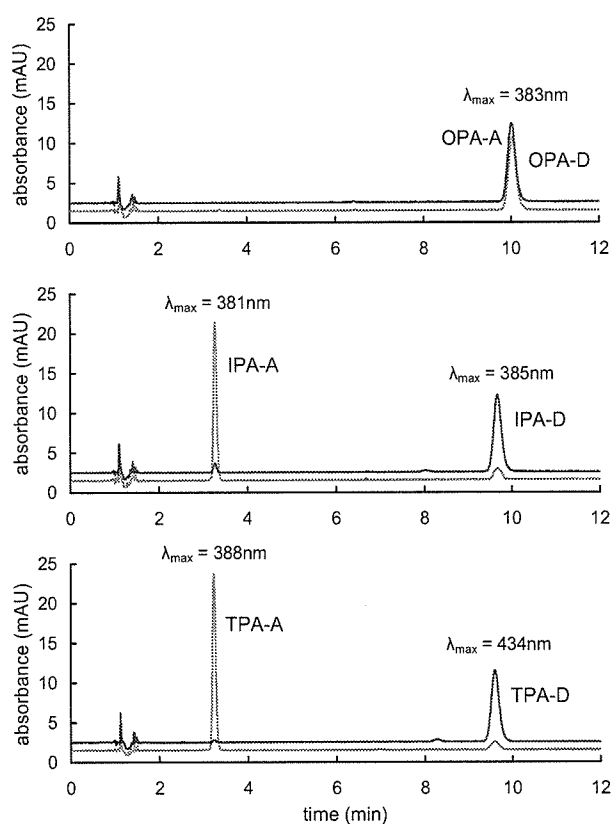


Fig. 1. HPLC chromatograms of OPA-DNPhydrazone (upper), IPA-DNPhydrazone (middle) and TPA-DNPhydrazone (lower) at maximum wavelengths by photo diode array detector. Light-colored chromatograms indicates the derivatives synthesized with excess of aldehyde and dark-colored chromatograms indicates the derivatives synthesized with excess of DNPH. Each concentration was 2 mg/L.

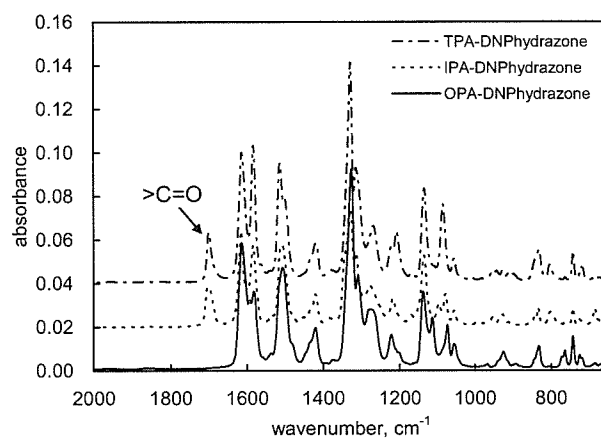


Fig. 2. FTIR spectra of OPA-A, IPA-A and TPA-A.

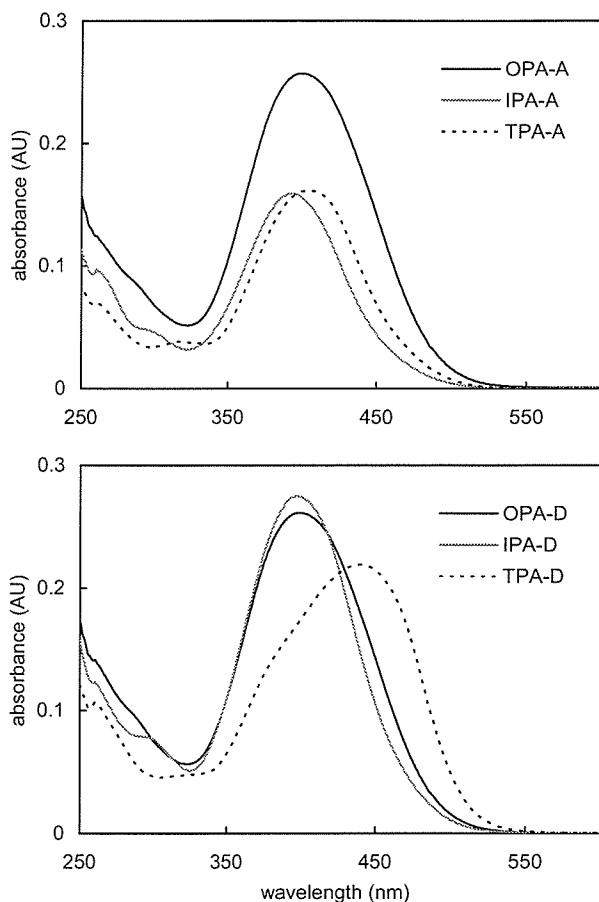


Fig. 3. UV-Visible spectra of OPA-, IPA and TPA-DNPhydrazone at 5  $\mu\text{mol/L}$ .

Fig. 2 の結果にしたがって、OPA-A, OPA-D, IPA-D, TPA-D はビス誘導体として、IPA-A, IPA-A はモノ誘導体として調整した。TPA-D を除いて、全ての紫外吸収スペクトルは共役二重結合を有する 2-アルケナール、ベンズアルデヒド<sup>22)</sup>の DNPH 誘導体のスペクトルに類似した。OPA-A, IPA-A, TPA-A, OPA-D, IPA-D, TPA-D の極大吸収波長は 400, 394, 404, 400, 398, 440 nm であった。そして、アセトニトリル溶液より 10~17 nm 長波長側に偏った。TPA-D のスペクトルは特異であり、440 nm 以外に 390 nm 付近の吸収も示唆される。ビス誘導体である OPA-D と IPA-D のモル吸光係数はそれぞれ  $5.2 \times 10^4$  と  $5.4 \times 10^4$  L/mol/cm であった。一

方、モノ誘導体である IPA-A と TPA-A のモル吸光係数はそれぞれ  $3.1 \times 10^4$  と  $3.2 \times 10^4$  L/mol/cm であった。すなわち、ビス誘導体のモル吸光係数はモノ誘導体より 1.7 倍大きいことになる。

## 2. オルトフタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の変移

DNPH-cartridge に OPA 標準ガスを 50 mL/min の流速で 5 時間通気した。その後、直ちに 5 mL の溶媒 (アセトニトリル, ジメチルスルホキシド, 酢酸エチル, メタノール) で抽出し、25°C に保った。アイソクラティックの HPLC で抽出液を 13 分毎に分析した。全ての溶媒で、モノ誘導体とビス誘導体の 2 つのピークが検出されたが、抽出溶液中でモノ誘導体はビス誘導体に変移した。抽出溶媒としてアセトニトリルを使用したときの、モノ誘導体からビス誘導体へ変移を Fig. 4 に示す。前述したように、OPA-DNPH の合成時には、どんな条件でもモノ誘導体は検出されなかった。しかし、DNPH-cartridge を使用した OPA の捕集時の反応は、モノ誘導体を生じた。OPA-モノ誘導体を単体で合成することができないので、OPA-モノ誘導体の濃度をピーク面積から計算することは不可能である。前述したように、極大吸収波長においてビス誘導体のモル吸光係数はモノ誘導体より 1.7 倍大きい。OPA-D のスペクトルは IPA-D と非常によく似ているので、OPA-モノ誘導体と IPA-モノ誘導体のモル吸光係数が等しいと仮定すれば、OPA-モノ誘導体のピーク面積は IPA-A のピーク面積から推定できる。Fig. 4 の B において OPA-モノ誘導体のデータは OPA モノ誘導体に対するモル吸光係数の比率 (1.7) を乗じることによって変換してある。抽出直後はモノ誘導体の量はビス誘導体より多い。しかし、時間が経つとモノ誘導体は減少し、ビス誘導体が

増加した。そして、ビス誘導体は  $0.032 \mu\text{mol}$  に相当する最大のピーク面積 ( $3.9 \times 10^5$ ) に達し、72 時間後でもビス誘導体の量は変化しなかった。抽出後してから 29 分後に総 OPA 誘導体量 (モノ+ビス) が最大のピーク面積に達した。総誘導体量 OPA の抽出直後 (3 分後) は最大ピーク面積の 71% であった。これらの結果から、DNPH-cartridge 内での DNPH と OPA の反応は比較的遅く、アセトニトリルで抽出してから反応が進行することが推測される。

OPA-モノ誘導体からビス誘導体への変換は溶媒の種類によって異なる。ジメチルスルホキシド (DMSO) を抽出溶媒にしたときのモノ誘導体からビス誘導体へ変移を Fig. 5 に示す。OPA と DNPH の反応速度は、ジメチルスルホキシドを溶媒にした方がアセトニトリルのときより遅い。 $0.033 \mu\text{mol}$  に相当する最大ピーク面積 ( $3.9 \times 10^5$ ) は抽出後 240 分で得られた。モノ誘導体からビス誘導体へ変移もアセトニトリルと異なり、抽出後 240 分経過しても、モノ誘導体量の方がビス誘導体量より多かった。しかし、72 時間後にはモノ誘導体は検出されず、 $0.033 \mu\text{mol}$  に相当する最大のピーク面積 ( $4.0 \times 10^5$ ) に達し、全てビス誘導体に変移したことが確認された。酢酸エチルを抽出溶媒にした場合は、OPA と DNPH の反応速度は非常に速かった。酢酸エチル (EtAc) を抽出溶媒にしたときの、モノ誘導体からビス誘導体へ変移を Fig. 6 に示す。抽出直後 (3 分) に  $0.031 \mu\text{mol}$  に相当する最大ピーク面積 ( $3.8 \times 10^5$ ) が観測された。抽出直後はモノ誘導体の量はビス誘導体より多い。しかし、時間が経つとモノ誘導体は減少し、ビス誘導体が増加した。抽出直後 (3 分) は 61% であったモノ誘導体が 240 分後には 17% にまで減少し、ビス誘導体は 39% から 83% に増加した。

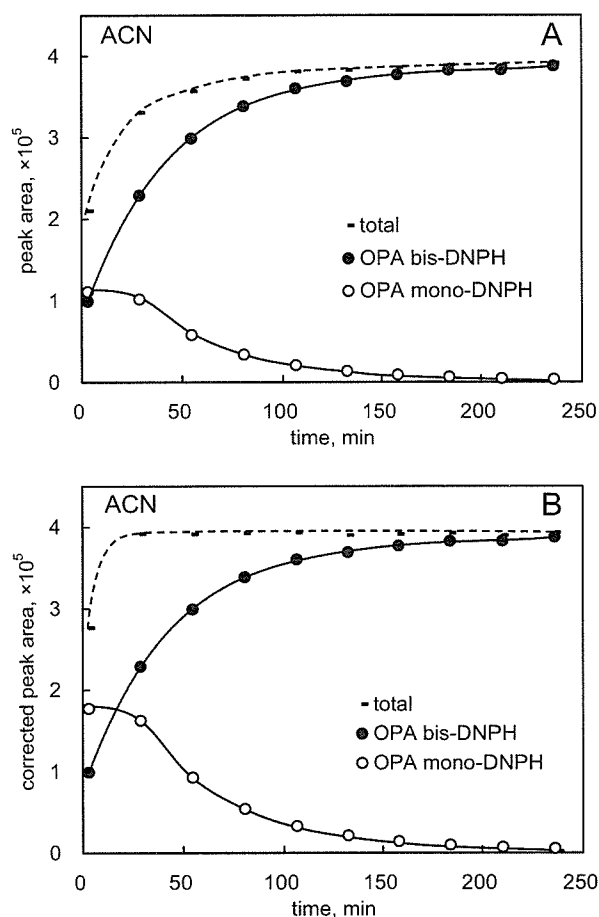


Fig. 4. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in acetonitrile. (Panel A) OPA mono-DNPhydrazone data were read directly. (Panel B) OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

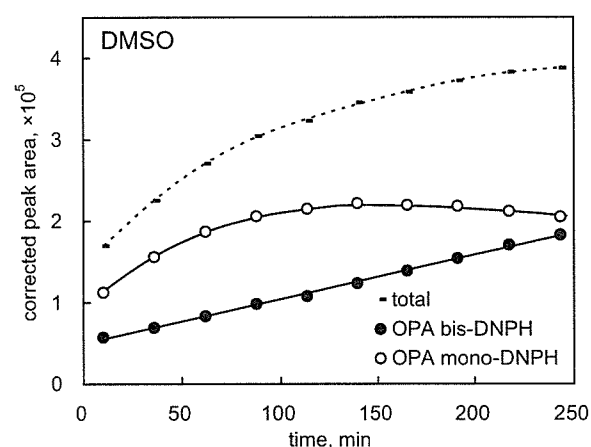


Fig. 5. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in dimethyl sulfoxide. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

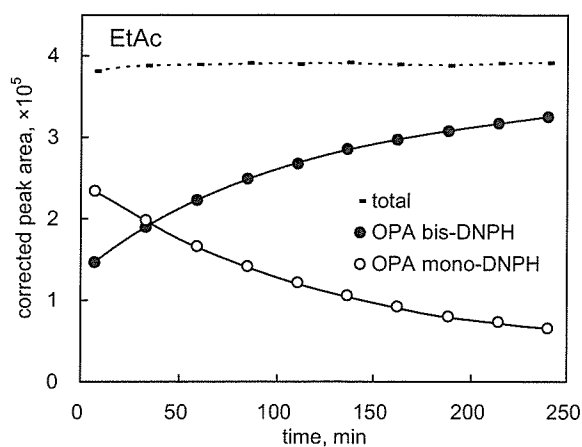


Fig. 6. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in ethyl acetate. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

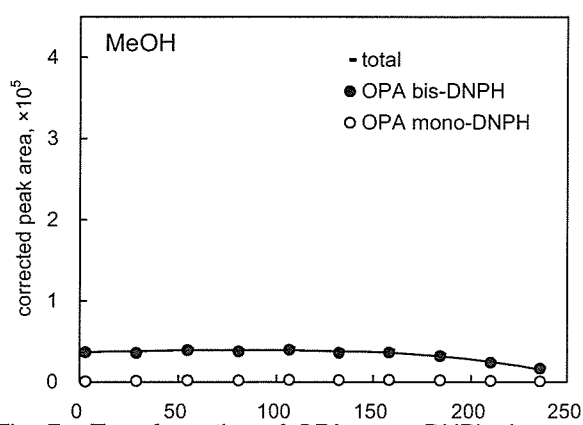
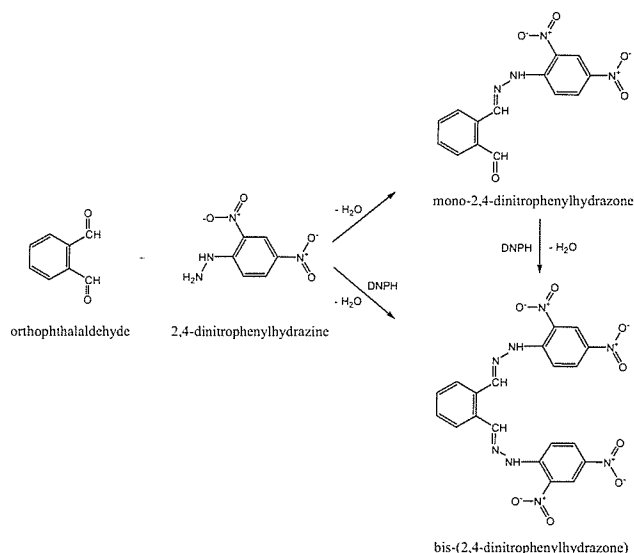


Fig. 7. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in methanol. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

そして、ビス誘導体は  $0.034 \mu\text{mol}$  に相当する最大のピーク面積 ( $4.1 \times 10^5$ ) に達し、72 時間後でもビス誘導体の量は変化しなかった。

OPA と DNPH の反応は非プロトン性極性溶媒で進みやすく、モノ誘導体からビス誘導体への変移は以下の反応により進行することが推測される。

メタノールを抽出溶媒としたときのモノ誘導体からビス誘導体への変移を Fig. 7 に示す。OPA と DNPH の反応は非常に遅く、また、モノ誘導体のピークは検出されなかった。抽出後 230 分間における最大ピーク面積 ( $0.43 \times 10^5$ ) は非常に小さく、



$0.0035 \mu\text{mol}$  の OPA しか検出されなかった。抽出してから 72 時間後、モノ誘導体は検出されず、ビス誘導体は  $0.0082 \mu\text{mol}$  に相当する  $1.0 \times 10^5$  のピーク面積しか検出されなかった。このことから、OPA と DNPH の反応はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチルなどの非プロトン性極性溶媒の場合進行しやすいが、メタノールなどのプロトン性極性溶媒の場合進行しにくいことが分かる。また、OPA-モノ誘導体からビス誘導体への変移は最終的に全ての溶媒で起こることが推測される。

### 3. 病院の洗浄室に置ける OPA の測定

病院の内視鏡消毒洗浄室の空気を  $250 \text{ mg}$  の DNPH-シリカゲルを充填した DSD-DNPH<sup>23)</sup> を使用して測定した。測定時間は 5 時間である。捕集後 DSD-DNPH をアルミ製保存袋から取り出し 4~5 回振った後、拡散フィルター側を上にしてシエルターを取り外す。DSD-DNPH のキャップ側を実験台等でタッピングした後、拡散フィルターを取り外し、アセトニトリルを満たした  $10 \text{ ml}$  の注射筒を取り付ける。2~5 ml/min の流速で溶出し、5 ml に定容する。溶出液の  $20 \mu\text{l}$  を分取し、グラジエントプログラムの HPLC に導入した。Fig. 8 に

2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンと 2,4-ジニトロフェニルヒドラジドの典型的なクロマトグラムを示す。標準溶液はカルボン酸類<sup>24)</sup>とアルデヒド、ケトン類の DNPH 誘導体 26 成分(10 μmol/l)から構成され、幾何異性体比を一定にするためにリン酸を 0.1%含んでいる<sup>25)</sup>。OPA-DNPH のピークはヘプタナール-DNPH とオクタナール-DNPH の間に検出され、他のピークと完全に分離された。

結論として、空気中のオルトフタルアルデヒドは DNPH-シリカゲルを用いた固体捕集でビス誘導体として HPLC で分析できることが明らかになった。

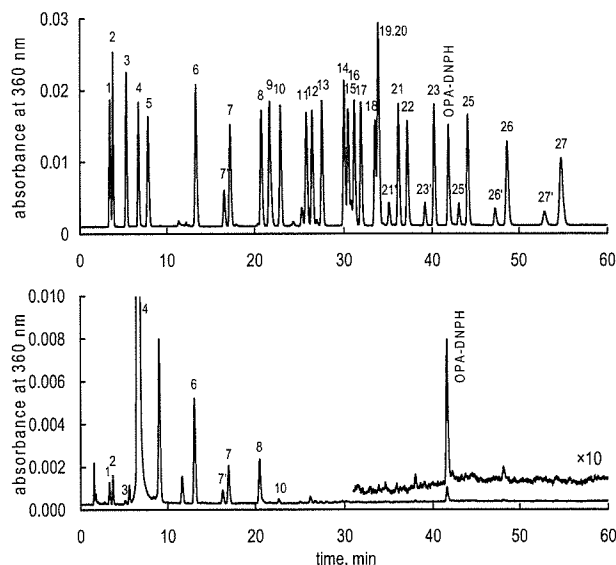


Fig. 8. Chromatograms of carboxylic acid and carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones. (A) Reference solution (10 μmol/L, 26 components). (B) Sample solution from workplace air. A prime sign indicates the Z-isomer.

1: formic acid-DNPH, 2: acetic acid-DNPH, 3: propionic acid-DNPH, 4: DNPH, 5: butyric acid-DNPH, 6: formaldehyde-DNPH, 7: acetaldehyde-DNPH, 8: acetone-DNPH, 9: acrolein-DNPH, 10: propanal-DNPH, 11: crotonaldehyde-DNPH, 12: 2-butanone-DNPH, 13: butanal-DNPH, 14: cyclohexanone-DNPH, 15: benzaldehyde-DNPH, 16: isopentanal-DNPH, 17: pentanal-DNPH, 18: o-tolualdehyde-DNPH, 19: m-tolualdehyde-DNPH, 20: p-tolualdehyde-DNPH, 21: hexanal-DNPH, 22: 2,5-dimethylbenzaldehyde-DNPH, 23: heptanal-DNPH, 25: octanal-DNPH, 26: nonanal-DNPH, 27: decanal-DNPH

#### D. 文 献

- 1) K. Rideout, K. Teschke, H. Dimich-Ward, S.M. Kennedy, *J. Hosp. Infect.* 59 (2005) 4.
- 2) E.R. Kennedy, Y.T. Gagnon, J.R. Okenfuss, A.W. Teass, *Appl. Ind. Hyg.* 3 (1988) 274.
- 3) Glutaraldehyde (NIOSH) Method 2532, Issue 1, US National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), 1994.
- 4) W. Hendricks, Glutaraldehyde (OSHA Method 64), Occupational Safety and Health Administration (OSHA), Organic Methods Evaluation Branch, OSHA Analytical Laboratory, Salt Lake City, UT, 1987.
- 5) S.L. Wellons, E.G. Trawick, M.F. Stowers, S.L.P. Jordan, T.L. Wass, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59 (1998) 96.
- 6) S.W. Tsai, S.S. Que Hee, *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 14 (1999) 255.
- 7) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, *J. Chromatogr.* 187 (1980) 413.
- 8) D.F. Magin, *J. Chromatogr.* 178 (1979) 219.
- 9) S.J. Swarin, F. Lipari, *J. Liq. Chromatogr.* 6 (1983) 425.
- 10) W. Schmied, M. Przewosnik, K. Baechmann, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 335 (1989) 464.
- 11) A. Büeldt, R. Lindahl, J.O. Levin, U. Karst, *J. Environ. Monit.* 1 (1999) 39.
- 12) J. Attal, S.M. Hendeles, K.B. Eik-Nes, *Anal. Biochem.* 20 (1967) 394.
- 13) R.A. Mead, G.C. Haltmeyer, K.B. Eik-Nes, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 554.
- 14) A. Cecinato, V. Di-Palo, R. Mabilia, M. Possanzini, *Chromatographia* 54



- (2001) 263.
- 15)D. Grosjean, Environ. Sci. Technol. 16 (1982) 254.
- 16)K. Kuwata, M. Uebori, H. Yamasaki, Y. Kuge, Y. Kiso, Anal. Chem. 55 (1983) 2013.
- 17)J.O. Levin, K. Andersson, R. Lindahl, C.A. Nilsson, Anal. Chem. 57 (1985) 1032.
- 18)F. Bohlmann, Chem. Ber. 84 (1951) 490.
- 19)Z. Rappoport, T. Sheradsky, J. Chem. Soc. (B) (1968) 277-291.
- 20)Method for the determination of formaldehyde in ambient air using adsorbent cartridge followed by high performance liquid chromatography (HPLC); 1998; U. S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development; Research Triangle Park, NC; Compendium method TO-11.
- 21)S. Uchiyama, S. Hasegawa, Atmos. Environ. 33 (1999) 1999.
- 22)S. Uchiyama, E. Matsushima, S. Aoyagi, M. Ando, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 157.
- 23)S. Uchiyama, S. Aoyagi, M. Ando, Atmos. Environ. 38 (2004) 6319.
- 24)S. Uchiyama, E. Matsushima, S. Aoyagi, M. Ando, Anal. Chem. 76, (2004) 5849.
- 25)S. Uchiyama, M. Ando, S. Aoyagi, J. Chromatogr. A 996 (2003) 95.

## IV-2. 1. 小型家庭用品の放散試験方法の開発

分担研究者 大坪 泰文 千葉大学 工学部 教授  
内山 茂久 千葉大学 工学部 非常勤講師  
協力研究者 松島江里香 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部 協力研究員

**研究要旨** 分子拡散サンプラー（DSD-VOC, DSD-DNPH）を用いて、樹脂製容器の内外部から発生する化学物質を測定する方法を開発した。試験製品の樹脂製密閉容器をテドラーバッグの中に入れ、密閉容器内部に DSD サンプラーを置くことにより、内部から発生する化学物質を捕集し、同時に、テドラーバッグ内に DSD サンプラーを置くことにより、外部から発生する化学物質を捕集した。悪臭を放つ飲用ボトルをサンプルとして測定を行ったところ、検出された VOC、カルボニル化合物のほとんどは内部の方が外部より発生量が多かった。また、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸が高濃度で検出され、悪臭の原因であることも明らかになった。これらの脂肪酸は合成樹脂の酸化防止剤として使用されていた物質が、分解して生成することが推測された。この他、可塑剤として使用されていたフタル酸エステル類の発生量も多く、フタル酸ジエチル、フタル酸ジイソブチル、フタル酸ジブチル、フタル酸 *n*-オクチルなどが検出された。これらのフタル酸エステルの中でフタル酸ジエチル、フタル酸ジイソブチルはボトル内部、外部とも同程度の発生量であったが、フタル酸ジブチル、フタル酸 *n*-オクチルはボトル外部より内部からの発生量の方が多いことがわかった。

本測定法により、密閉空間から発生する化学物質の測定を簡便に行うことが可能になった。

### A. 研究目的

VOCs による室内汚染を低減化させるためには、建材・施工材、家庭用品等から VOCs がどの程度発生しているのか、放散量の実態把握が必要となってくる。そのため、材料からの発生量を高い精度で測定する必要があり、チャンバーを用いて材料からの発生量を測定することが欧米を中心として行われている。

このチャンバー法は公定法として、米国の方法（American Society for Testing and Materials, ASTM）、ヨーロッパの方法

（European Collaborative Action, ECA）

に大別できる。そして、ホルムアルデヒドと VOCs に関しては、チャンバーに対する考えが多少異なっている。すなわち、ホルムアルデヒド放散量の測定には、大型チャンバー法と小型チャンバー法がある。大型チャンバーの米国 ASTM 規格は、E1333-96<sup>1)</sup>に示されている。測定チャンバーはステンレスあるいは他の金属、ガラス製で 22 m<sup>3</sup> のサイズである。また、測定環境条件は 25°C/50%RH、換気回数は 0.5±0.05 とされている。米国ではホルムアルデ

ヒドに関して D6007-96<sup>2)</sup>という小型チャンバー規格があり、チャンバー容積は 20～1000 L である。実験条件は、同様に 25 °C ±1 °C, 50 % RH ±4 % である。一方、ヨーロッパで用いられている大型チャンバーに関しては、ECA レポート No.2<sup>3)</sup>に示されている。ECA では小型チャンバーが 0.02～1 m<sup>3</sup>, 大型チャンバーは 12～80 m<sup>3</sup> と定義されている。測定条件は 23±0.5 °C, 45±3%RH, 換気回数は 1±0.03 である。

VOCs 測定に関しては小型チャンバーが主として用いられている。米国には ASTM D5116-90<sup>4)</sup>規格がある。欧州共同研究レポートでは、No.8<sup>5)</sup>で小型チャンバー測定方法に関して述べ、No.13<sup>6)</sup>, No.16<sup>7)</sup>において、ヨーロッパ研究機関での測定例に関して述べている。小型チャンバーの規格には、サイズなどの具体的記述がないため、各研究機関が ASTM あるいは欧州共同研究レポートを参照して作製している。材料に対する面風速は 0.3～0.5 m/s の範囲、実験に重要なパラメータは、温度、湿度、換気回数、ローディングファクター、時間である。

以上、開放された材料から放散する化学物質の測定方法として多くの方法が確立されているが、閉鎖された小さな空間内部の測定方法はない。閉鎖空間は化学物質が滞留しやすく濃度が高くなる、そのため複雑な化学反応が起こり予想外の化学物質が生成する可能性もある。特に、人の健康を考えた場合、プラスチック製の容器等(水筒、弁当箱)の内部から発生する化学物質は、そのまま人が摂取するので重要である。しかし、このような閉鎖空間の化学物質についての報告は無い。閉鎖空間の化学物質を測定するとき、アクティブサンプリング法で行うと、強制換気が発生するため正確な測定ができない。拡散サンプリング法は分子拡散の原理に基づき、静的に化学物質を捕集する方法であり、空気の移動を伴わな

い。したがって、閉鎖空間の測定には最適である。

本研究では Uchiyama らが開発した拡散サンプラー (DSD-VOC<sup>8)</sup>, DSD-DNPH<sup>9,10)</sup>を用い、プラスチック製容器の内側と外側から発生する化学物質を測定し、その発生メカニズムを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 装置と試薬

**加熱脱離装置** : オートサンプラー (ULTRA) を備えたサーマルディゾーバー (UNITY, MARKES 社製) を使用した。捕集管の一次脱離は 280°C で 8 分間行い、1:15 の比率でスプリットして二次濃縮管に導入した。二次濃縮管には Tenax TA (5 mm), Carbotrap B (15 mm) を使用し、濃縮時の温度は -10°C, 加熱は 250°C で 5 分間行った。

**GC** : GC は 6890 (アジレント社製) を使用した。分離カラムは, EQUITY™-5 (60 m×0.25mm i.d., 1.0 μm film, スペルコ社製) を使用し、以下の昇温条件で分析した。

40°C (5 min) → 100°C (10°C /min) → 280°C (40min)

**MS** : MS は 5972 (アジレント社製) を使用した。イオン源温度は 250°C, イオン化電圧は 70 eV であった。

**HPLC** : 2 台の送液ポンプ LC-10ADvp, オートサンプラー SIL-10Advp, 紫外検出器 SPD-10Avp, フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp を備えた LC-10 (島津製作所製) を使用した。分離カラムは Ascentis RP-Amide (250 mmL × 4.6 mm i.d. 5 μm particle size, スペルコ社製) を用いた。送液は移動相 A : アセトニトリル / 水, 40 / 60 v/v, 移動相 B : アセトニトリル / 水, 75 / 25 v/v を用い、以下のプログラムで 2

液グラジエント分析を行った。

Time (min) 0 8 30 60

A (%) 100 100 0 0

流速は 1.5 mL/min であった。

試薬: HPLC および試薬の調整には Milli-Q Water System を使用した。アセトニトリルは HPLC grade (リーデルデハーン社製) を使用した。

## 2. DSD-サンプラーの使用法

閉鎖空間における VOC の測定には DSD-VOC<sup>8)</sup> を、カルボニル化合物の測定には DSD-DNPH<sup>9,10)</sup> を使用した。

**DSD-VOC:** 吸着剤として Carbo-pack Z を 100 mg 充填した ATD-tube を 350°C で 5 時間コンディショニングした後、ATD-tube の一端のフリットを取り外し、拡散フィルターを取り付ける。暴露開始時に、拡散フィルター側を下にして ATD-tube の吸着剤を拡散フィルターに移す。一定時間空气中に暴露した後、拡散フィルター側を上にして吸着剤を再び ATD-tube 側に戻す。拡散フィルターを外した後、フリットを取り付けてから加熱脱離装置—GC/MS で分析した。分析終了後、ステンレスチューブを再びエージングすることで DSD-VOC 再生し、繰り返し測定ができる。DSD-VOC の測定方法の概要を Fig. 1 に示す。

**DSD-DNPH:** Fig. 2 に DSD-DNPH によるアルデヒド、ケトン類、カルボン酸類の測定方法の概要を示す。捕集開始時に、DSD-DNPH (スペルコ社製) をアルミ製保存袋から取り出し、シェルターチューブを外した後、拡散フィルター部を下にして固定する。一定時間暴露した後、捕集終了と同時にシェルターを取り付け、アルミ製保存袋に保管する。カルボン酸類分析のため<sup>11)</sup>,

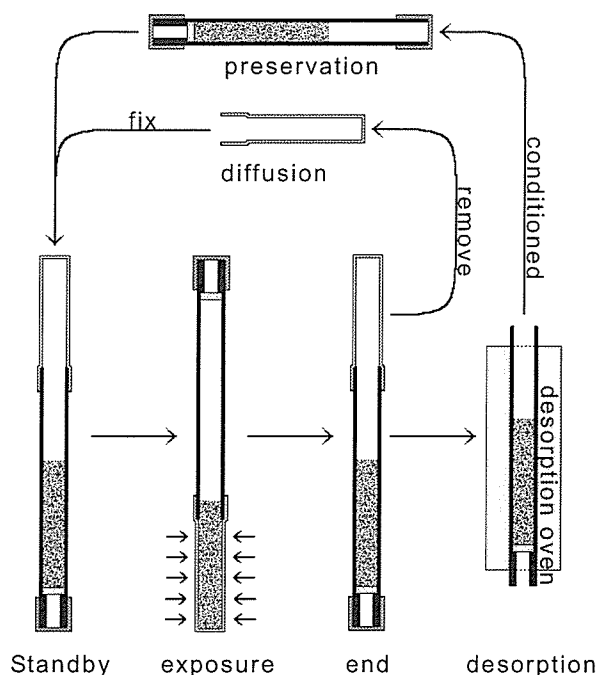


Fig. 1. Schematic diagram of the DSD-voc in conditioning, sampling, and analysis.

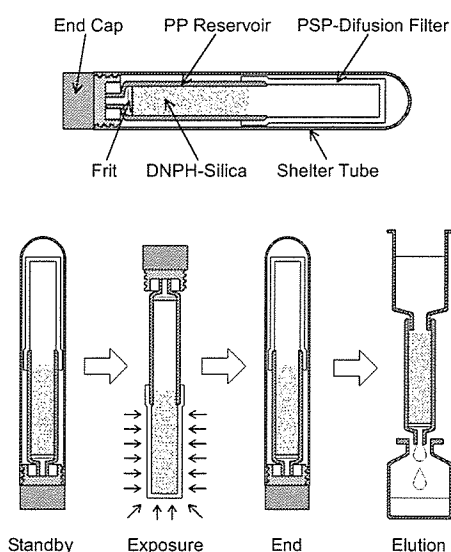


Fig. 2. Measuring carbonyls using the DSD-DNPH device. The collection and the elution steps are conducted by transferring the absorbent to the PSP-diffusion filter and PP-reservoir, respectively.

分析時に DSD-DNPH をアルミ製保存袋から取り出し、80°C で 5 時間加熱した後、4~5 回振り拡散フィルター側を上にしてシェルターを取り外す。DSD-DNPH のキャップ側を実験台等でタッピングした後、拡散フィルターを取り外し、アセトニトリルを満たした 10 ml の注射筒を取り付ける。2~5 ml/min の流速で溶出し、5 ml に定容