

3. グリシドールに関する測定方法 (固体捕集方法-HPLC)

3.1 測定方法に関する情報収集

NIOSH manual of analytical methods, 1608 に規定されるグリシドール測定法 (活性炭管捕集-GC-FID) は、脱着溶媒 (THF) とグリシドールのピークが分離しないこと、脱着率が良くないことや検出感度が十分でないことなどにより、NIOSH の測定方法をそのまま我が国の作業環境測定法の測定法として導入することは難しい (発がん性、生殖毒性、神経毒性等有害性の考えられる物質に対する作業環境測定手法の検討報告書、平成 13 年 3 月、(社) 日本作業環境測定協会)。

グリシドールの TLV-TWA が 2 ppm であることやグリシドールが発がん物質第 2 群 A に暫定的に分類 (産業衛生学会) されたことを考慮して、グリシドールの高感度定量法の開発を試みると共に、NIOSH methods, 1608 に規定される活性炭管捕集の有効性について検討した。

【目的】

グリシドールはエポキシ樹脂の原材料、ビニルポリマーや天然オイルの安定剤、衛生薬品など産業界で幅広く使用されている、揮発性有機化合物である。グリシドールは、化学式 $C_8H_6O_2$ 、モル質量 134 g/mol、比重 1.114、沸点 167 °C のエポキシ化合物で、刺激性、感作性、生殖毒性、中枢神経抑制、発癌性を示す事が知られている。米国 ACGIH はグリシドールの TLV-TWA を 2 ppm と勧告している。しかし日本では 2001 年に日本産業衛生学会に発癌物質分類第二群 A に暫定的に分類 [1] されたが、許容濃度、管理濃度は設定されていないのが現状である。

現在、環境空气中的グリシドールの代表的な分析方法は、ガスクロマトグラフィー (GC) である。米国労働安全衛生研究所 (NIOSH) の Analytical Method 1608 に規定された方法 (GC-FID) では、TLV-TWA の 2 ppm を精度よく定量することは困難である [2]。グリシドールの発癌性を考えると、低濃度まで精度良く定量できる方法を開発する必要がある。

そこで、本研究ではグリシドールが水酸基を持つことに着目し、蛍光ラベル化剤 1-AN を用いてプレカラム誘導体化を行い、生成された誘導体を HPLC-FD で測定する新たな高感度定量法の開発を試みた。1-AN を用いた、グリシドールのエステル化反応を図 1 に示した。

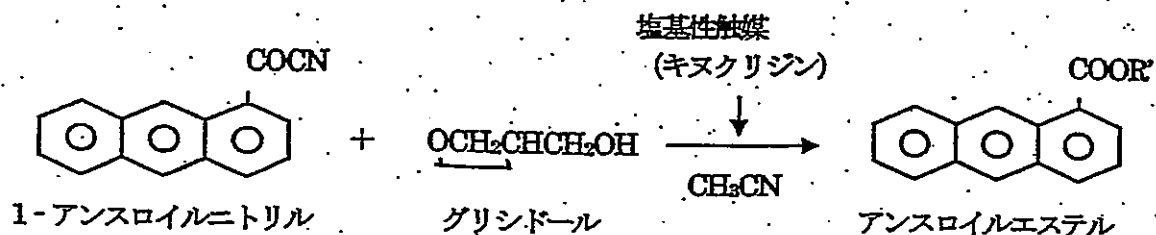


図 1 1-アンスロイルニトリルとグリシドールのエステル化反応

3.2 測定方法の検討

1. 試薬の調整: グリシドール (96% <) 及びエチルアルコール (内部標準物質, LS.) は、アセトニトリル (有機合成用) に溶解し標準液とした。蛍光ラベル化剤 1-AN 及び触媒として用いたキヌクリジンもアセトニトリルに溶解した。グリシドール及びキヌクリジンは Aldrich, その他の試薬は和光純薬から購入した。また、アセトニトリルは必要に応じてモレキュラーシーブで乾燥したものを用いた。
2. 装置及びHPLCの分析条件: HPLCは日立製作所製 L-7500型を用い、以下の条件で分析を行った。カラム: Wakosil-II 5C 18HG, 4.0×150 mm
移動相: アセトニトリル-水 (65:35, v/v), 流速 1.0 ml/min, カラム温度: 35°C
検出器: L-7480 蛍光検出器 (励起波長 360 nm, 蛍光波長 460 nm)
3. 標準定量操作: 小型ねじ口試験管にグリシドール標準液 20 ~ 100 μ l, アセトニトリル 100 ~ 180 μ l, LS.液 100 μ l, 1.0%キヌクリジン液 100 μ l, 最後に0.1% 1-AN液 100 μ lを加えて反応液の総量を 500 μ lとして反応を開始させた。30分間室温で反応させた後、反応液にアセトニトリル 1 mlを加えて反応を停止させた。この溶液 200 μ lを Sep-Pak カートリッジ (C₁₈, 360 mg, Waters) に添加し、70%アセトニトリル水溶液 5 mlで、グリシドールと LS.の両誘導体を溶出させ、70%アセトニトリル水溶液で 10 mlにしたものを最終試料液とし、その 20 μ lを HPLC に導入した。グリシドールの定量には内部標準法を用いた。
4. 脱着率の測定法: 活性炭に既知量のグリシドール標準液を直接スパイクし、一晚冷蔵保存 (4°C) させ脱着率試験用に用いた。翌日、内容量 15 ml のバイアル瓶にスパイク済みの活性炭 100 mg を移し、ジクロロメタン-アセトニトリル混合溶液を 1 ml 加えた後、30分間振とうさせ脱着した。混合脱着溶媒のジクロロメタンの含有率を変化させてグリシドールの脱着率を調べ、グリシドール誘導体の回収が良好である混合脱着溶媒を選定した。この時、活性炭にスパイクしたグリシドール量は 111 μ g であり、これは環境空气中を 5L 採気したとき約 1ppm に相当する。

3.3 測定方法の検討結果

1. エステル化反応における触媒効果: 触媒を用いることでグリシドールと 1-AN のエステル化反応が迅速に進むことが分かっており、キヌクリジンとトリエチルアミンの二種類の塩基性触媒について、単独で用いた場合とそれらを混合して用いた場合の効果を検討した結果、キヌクリジンを単独で用いた場合が最も効果的であった。
2. 誘導体化の最適反応条件: グリシドール標準液 (1.89 μ g/ml) と 0.1% 1-AN 液を用いて誘導体化の最適反応条件について調べた。キヌクリジンの濃度範囲を 0.01 ~ 2.5% まで変化させて、誘導体生成に及ぼす効果を調べた結果、キヌクリジン濃度が 1.0% のときに最もグリシドール誘導体の生成量が最大となった。また、キヌクリジンの濃度を 1.0% として、反応温度と反応時間を変化させて誘導体の生成量を調べた結果、反応温度を室温、反応時間を 30 分とした時、誘導体生成量が最大となった。したがって、誘導体化の最適反応条件を 1-AN を 0.1%、キヌクリジン濃度 1.0%、反応温度を室温、反応時間を 30 分と設定した。
3. 検量線: グリシドール標準液 (1.89 μ g/ml) を 20~100 μ l と LS. 液 100 μ l を加え標準定量操作に従って分析を行い、検量線を作成した。その結果、少なくともこの範囲内では、原点を通る良好な直線 ($r=0.997$) が得られた。

表1. 分析方法の精度

標準液濃度	6.97 $\mu\text{g/ml}$	13.93 $\mu\text{g/ml}$	27.85 $\mu\text{g/ml}$
	0.45 ppm	0.90 ppm	1.8 ppm
	54642	90601	182851
	55447	89505	184045
ピーク高さ	54712	91220	185383
	55067	93505	198189
	55360	86387	189854
平均	55045	90244	186066
標準偏差	365.6	2604.6	6248.6
変動係数(%)	0.664	2.88	3.36

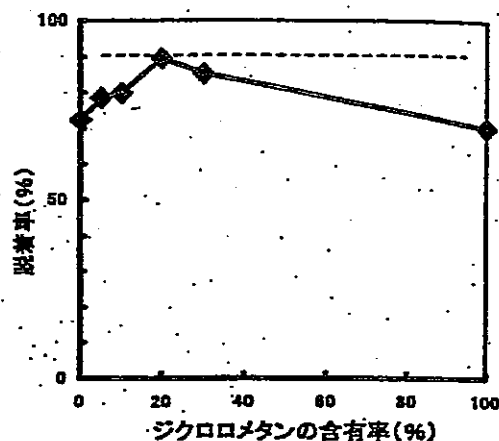


図2. 脱着率の変化

4. 検出下限・定量下限：グリシドール標準液（0.43 $\mu\text{g/ml}$ ）を、標準定量操作に従って繰り返し（ $n=5$ ）分析し、検出下限（ 3σ ）と定量下限（ 10σ ）濃度を求めた。その結果、検出下限濃度は22 ng/ml、定量下限濃度は74 ng/mlであった。定量下限濃度は環境空気を5 L採気した場合、4.9 ppbに相当し、TLV-TWA 2 ppmの1/400まで定量が可能であることが分かった。
5. 固相抽出：エステル化反応によって生じた保持容量の大きなきょう雑物を除去し、分析時間を短縮させる目的で固相抽出を行うことにした。グリシドール標準液（1.11 $\mu\text{g/ml}$ ）を用いて抽出溶媒と抽出率を検討した結果、70%アセトニトリル水溶液5 mlを用いて抽出した時、グリシドール誘導体の回収率は101.1 \pm 0.7893%、IS誘導体の回収率は100.4 \pm 1.537%であり、回収率は良好であった。固相抽出を行った結果、保持時間40分あたりに検出されるピークを除去でき、1分析が15分以内に終了した。
6. 分析方法の精度：3種類のグリシドール標準液（6.97, 13.93, 27.85 $\mu\text{g/ml}$ ）を用いて、分析方法の精度を調べた結果、変動係数として0.664%, 2.88%, 3.36%と良好であった（表1）。
7. 脱着率：NIOSHの測定法では、環境空気中のグリシドールの捕集に活性炭を採用している。そこで、活性炭に既知量のグリシドールをマイクロシリンジで直接スパイクし、一晚冷蔵保存（4 $^{\circ}\text{C}$ ）させ脱着試験用として用いた。翌日、内容量15 mlのバイアル瓶にスパイク済みの活性炭を移し、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ジクロロメタン等を用いて活性炭からのグリシドールの脱着率を検討した。その結果、ジクロロメタンとアセトニトリルの混合溶液を用いた場合の脱着率が良好であったため、ジクロロメタンの含有率を変化させて詳しく調べた。ジクロロメタンの含有率を0～100%の範囲内で変化させ、脱着率を調べた結果、ジクロロメタンの含有率が20%の脱着溶液を用いたときの脱着率は平均89.4 \pm 3.47%（ $n=5$ ）となり最も高かったため、脱着溶液を20%ジクロロメタン-アセトニトリル混合溶液と選定した（図2）。
8. 標準物質のクロマトグラム：グリシドール標準液とエタノール液（IS.）を標準定量操作に従って反応させた時の標準物質のクロマトグラムを図3に示した。保持時間4.3分にグリシドール誘導体のピーク、保持時間8.0分にIS誘導体のピークが得られた。両ピークともほぼ完全に分離した。分析時間は約10分を要した。

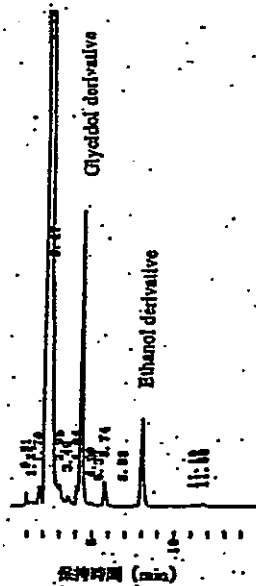


図3. 標準物質のクロマトグラム

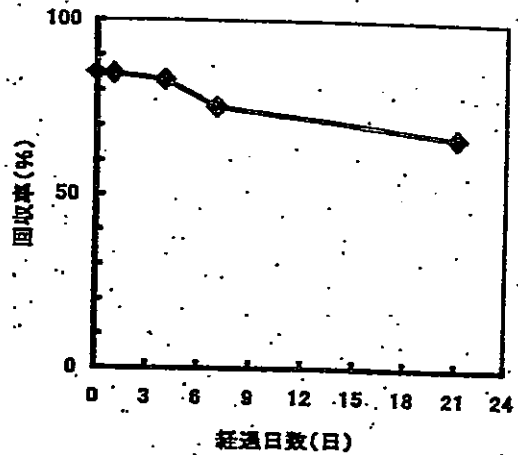


図4. 捕集管(活性炭)での保存安定性

9. 試料の安定性

- 9-1. 最終試料液の保存安定性: グリシドール標準液 (2.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と IS 液を標準定量操作に従って反応させた後、冷蔵保存 (4 $^{\circ}\text{C}$) した。最終試料液調製直後とその3時間後、6時間後、24時間後にそれぞれ分析を行い (n=4)、試料の安定性を調べた結果、測定値はほとんど変化せず、安定性は良好であった。
- 9-2. 活性炭上での保存安定性: 活性炭に既知量のグリシドール標準液をマイクロシリンジでスパイクし、冷蔵保存 (4 $^{\circ}\text{C}$) した時の捕集管 (活性炭 100 mg) での安定性を調べた。活性炭にグリシドール標準液スパイクした直後、翌日、4日後、7日後、21日後にそれぞれ分析を行った。スパイクした翌日の回収率は $84.7 \pm 1.83\%$ 、4日後は $81.7 \pm 1.06\%$ 、7日後は $75.3 \pm 1.34\%$ 、21日後は $67.0 \pm 1.18\%$ となり、回収率はしだいに低下していく。そのため、捕集後はすみやかに分析する必要がある (図4)。

3.4 まとめ

- 蛍光ラベル化剤 1-AN とグリシドールとのエステル化反応は、塩基性触媒の存在下、室温で迅速に進行した。本 HPLC-FD 法の繰り返し精度は良好であった。
- 生成されたグリシドール及び IS の誘導体は逆相クロマトグラフィーで短時間内に分離・定量できた。
- 本 HPLC-FD 法の定量下限濃度は $74 \text{ ng}/\text{ml}$ で、この値は環境空気を 5L 採気の時、49 ppb に相当し暴露限界 2 ppm の 1/400 まで定量が可能である。
- NIOSH Method 1608 に示されたグリシドールの捕集法は、脱着率や試料の安定性に問題があることが分かった。したがって、適切な捕集法を検討する必要がある。

【参考文献】

1. 日本産業衛生学会 (2001): 発がん物質暫定物質の提案理由。日本産業衛生学雑誌 43(7): 150 - 151.
2. (社) 日本作業環境測定協会編 (2001): 発がん性、生殖毒性、神経毒性等有害性の考えられる物質に関する作業環境測定手法の検討。(社) 日本作業環境測定協会

出典: 発がん性、生殖毒性、神経毒性等有害性の考えられる物質に対する
作業環境測定手法の検討報告書(平成14年3月)

2. クロトンアルデヒドに関する測定手法

クロトンアルデヒド

方法番号:	81
基質:	空気
ターゲット濃度:	2ppm (6 ミリグラム/立方メートル)
手順:	サンプルを、各々が2,4-ジニトロフェニルヒドラジンおよびリン酸でコーティングされた2つのガラス・ファイバー・フィルターが入ったオープン・フェイス・エアー・モニター・カセットを通して吸引することによって集める。アセトニトリルを用いてサンプルを抽出した後、UV検出計を用いてHPLCにより分析する。
空気容量および サンプリング速度の勧告値:	0.1 リットル/分 において、6 リットル
信頼できる定量限界:	32ppb (93 マイクログラム/立方メートル)
ターゲット濃度における 推定値の標準誤差: (セクション 4.7)	7.6 %
特に必要なこと:	ラボラトリーでサンプルを受け取ったら、-20°Cで保存すべきである。そのような保存が不可能な場合、採集後9日以内に分析しなければならない。(セクション 1.2.5.) 光分解を防ぐため、できるだけサンプルを暗所で保存すること。
この方法の現状:	評価済みの方法である。この方法は、Organic Methods Evaluation Branch の複数の「確立された評価手順」により、評価されてきた。

日付: 1990年4月

化学者: Warren Hendricks

Organic Method Evaluation Branch
OSHA Analytical Laboratory
Salt Lake City, Utah

<測定方法の検証>

クロトンアルデヒド 分析手順 OSHA 81

1、捕集

硫酸及び DNPH 処理した直径 37mm のグラスファイバーフィルタを 2 組保持するカセット型フィルタフォルダを用い、捕集速度 0.2L/分で 10 分以上空気を吸引する。

2、抽出

グラスファイバーフィルタを 4ml のバイアルに移し、アセトニトリル 3ml を加え、ロータリーミキサーで 30 分攪拌してクロトンアルデヒド-DNPH 誘導体を抽出する。

3、分析

紫外吸光検出器付き HPLC を用い、クロトンアルデヒド-DNPH 誘導体の 365nm の吸収を測定する。

分析条件：

移動相： 40/60 アセトニトリル/水+リン酸 0.1%

流速： 1.0 ml/min

UV 検出器： 365nm

試料注入量： 20 μ L

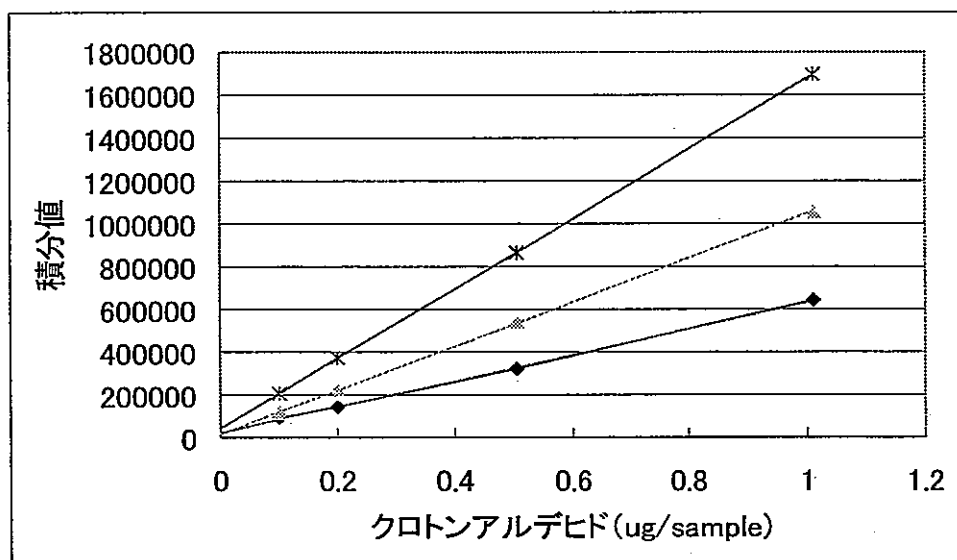
カラム： 25 cm \times 4.6mm Z o r b a x CN

保持時間：10.2 分 及び 16.1 分

検討事項

1、検量線

クロトンアルデヒドのアセトニトリル溶液、DNPH・リン酸のアセトニトリル溶液を用いて発色操作を行い検量線を作成した。



検量線は下から 10.1 分のピーク、16.2 分のピーク、2 つの和である。

生成する誘導体は、はじめ 10.1 分が大きく、次第に 16.1 分の成分が増える。OSHA の解説では 2 つのピークは 1 日後にほぼ同程度の大きさとなるとされているがそうはならなかった。ただし 2 つのピーク面積の和は、反応後 1-4 日でほぼ一定なので、和を用いればよい。市販のサンプラーを用いて誘導体化した場合は、16.1 分のピーク面積が 2 つの面積の和の 90% 程度となる。

検量線に用いた最低濃度 (100ng/sample) を定量下限とすると、相当する気中濃度は、捕集空気量 2L の場合、0.02 ppm である。

注：SKC 社のサンプラーは、DNPH が分解している場合があり、上記検出下限程度のピークが測定ピークの近傍にあり妨害となる可能性があるため、現実には 0.02 ppm の測定は困難な場合がある。

DNPH を再結晶して精製し、サンプラーを作成するのが望ましい。

出典：独立行政法人産業医学総合研究所作業環境計測研究部

菅野誠一郎主任研究官の作成資料 (平成 16 年 10 月)

<OSHAの分析法>

ヒドラジン

方法番号： 108

基質： 大気

ターゲット濃度： 10 ppb (13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) または 1 ppm (1.3 $\text{m g}/\text{m}^3$)

OSHA 曝露限度： 1 ppm (1.3 $\text{m g}/\text{m}^3$)

ACGIH TLV： 10 ppb

分析手順： 試料は、硫酸処理した直径 37mm のグラスファイバーフィルタを 2 組保持するカセット型フィルタフォルダに空気を吸引して採取する。フィルタは、EDTA 2Na を含む緩衝溶液で抽出する。抽出溶液の一部にベンズアルデヒド溶液を加えヒドラジンからベンザルアジンを生成する。ベンザルアジンを液体クロマトグラフで分離し紫外吸光検出器を用いて定量する。

捕集空気量と捕集速度
の推奨値： 240L 1.0L/分

信頼できる定量下限値： 0.058 ppb (0.076 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

ターゲット濃度での誤差 7.5% (10ppb)
5.2% (1 ppm)

分析法の評価： 評価済みの方法。この方法は、Organic Methods Evaluation Branch の規定の手順で評価されている。

日付：1997年2月

担当者 Carl J. Elskamp

Organic Methods Evaluation Branch
OSHA Salt Lake Technical Center
Salt Lake City, UT 84165-0200

<測定方法の検証>

ヒドラジン 分析手順 OSHA 108

1、捕集

硫酸処理した直径 37mm のグラスファイバーフィルタを 2 組保持するカセット型フィルタフォルダを用い、捕集速度 1 L/分で 10 分以上空気を吸引する。

2、抽出

グラスファイバーフィルタを 7 ml のバイアルに移し、EDTA 2Na 0.05M リン酸二水素ナトリウム 0.1M 溶液の pH をリン酸で 3.5 に調製した緩衝液 5 ml を加え、ロータリーミキサーで 30 分攪拌してヒドラジンを抽出する。

3、発色操作

ベンズアルデヒドを加え、ヒドラジンと反応させベンザルアジンを生成する。

ベンズアルデヒドのアセトニトリル溶液 (1% V/V) を発色液とする。

抽出液 1 ml を 2 ml のバイアルに取り、発色液 0.5 ml を添加しよく混合する。室温で 30 分以上反応させる。

4、分析

紫外吸光検出器付き HPLC を用い、ベンザルアジンの 300nm の吸収を測定する。

分析条件：

移動相： 67/33 アセトニトリル/水

流速： 1.0 ml/min

UV 検出器： 300nm

試料注入量： 20 μ L

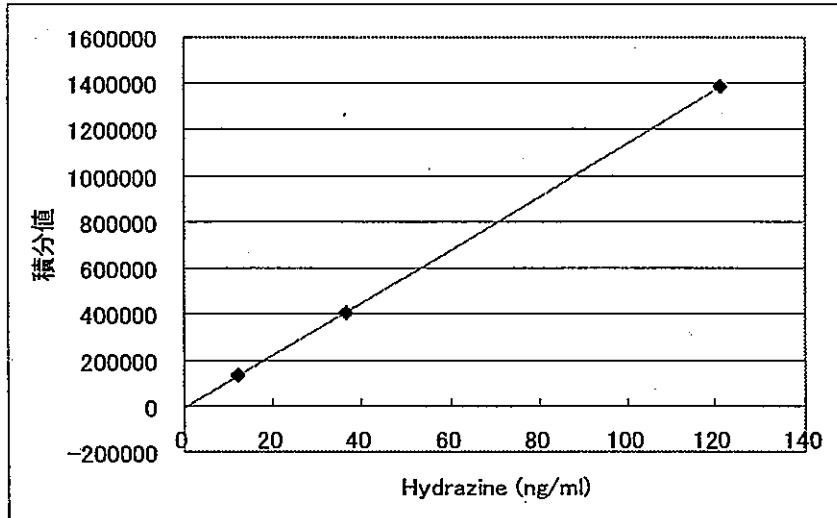
カラム： 25 cm \times 4.6 mm Zorbax ODS

保持時間： 8.7 分

検討事項

1、検量線：

ベンザルアジンのアセトニトリル溶液を用い、検量線を作成した。



重相関係数：0.9999 $Y=11470X-8190$

積分値は、検出器の測定レンジ 0.02 の値。

定量下限：

検量線の作成に用いた最小濃度 12ng/ml を定量下限とすると 気中濃度は、採取空気量を 10L (10分) とした場合 7ppb に相当する。

2、捕集効率等

カセット式サンプラーの前層のフィルタに空気を吸引しながらヒドラジンのメタノール溶液 (2.4 μg/ml) 50 μl を滴下しその後 30分 1L/分の速度で空気を吸引し、抽出、発色、分析を行った。後層のフィルタにはヒドラジンは検出されず前層のフィルタの捕集効率は 100%、測定値の変動係数は、4.2%、全体の回収率は 91%であった。

出典：独立行政法人産業医学総合研究所作業環境計測研究部

菅野誠一郎主任研究官の作成資料 (平成16年10月)