

しろう脳

分析測定法に関する検討結果報告書

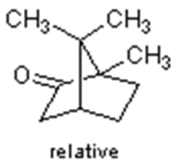
目次

1. はじめに.....	1
2. 文献調査.....	1
3. 捕集及び分析条件.....	2
3-1 捕集条件.....	2
3-2 分析条件.....	2
4. ブランク.....	3
5. 破過.....	3
6. 脱着率.....	4
7. クロマトグラム.....	4
7-1 環境中の濃度計算.....	5
8. 検量線.....	5
9. 検出下限及び定量下限.....	5
10. 添加回収率（通気試験）.....	6
10-1 添加試験.....	6
10-2 ろ紙へ付着した、しょう腦の回収率試験.....	6
11. 保存性.....	7
12. まとめ.....	8
13. 検討機関.....	8
14. 参考文献.....	8

1. はじめに

しょう脳は昇華性物質であり、古くはクスノキ由来の精油を粗製しょう脳、蒸留したものをしょう脳原油として外用医薬品、カンフル剤として利用されてきた。今日では合成しょう脳が松脂由来のテレピン油 (α ピネン) を原料に製造される¹⁾。しょう脳の物理化学的性状を以下に示した^{2),3)} (表 1)。

表 1 しょう脳の物理化学的性状

CAS No.	76-22-2	
別名	(±)-カンファー、Camphor、2-Camphanone 1,7,7-Trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-one	
用途	医薬品、強心剤 (カンフル剤)、防虫剤、焼結金属用バインダー、香料用原料、セルロイド原料	
構造式	 <chem>C10H16O</chem>	
分子量	152.26	
物性	比重	0.99
	沸点 (°C)	204
	融点 (°C)	180
	蒸気圧 (Pa)	27 (20°C) : 0.2 mmHg (OSHA)
	形状、特徴	常温で固体、昇華性、特有臭水に 0.12 g/100 mL (25°C) 溶解
許容濃度等	日本産業衛生学会	なし
	OSHA PEL (TWA)	2 mg/m ³
	ACGIH TLV (TWA) MAK-Wert、UK-TLV	2 ppm 12 mg/m ³
	ACGIH TLV (STEL)	3 ppm 19 mg/m ³

本手法では、しょう脳の暫定 2 次評価値 (E) を 2 mg/m³ とした。これは産衛 (許容濃度)、OSHA (TWA) または ACGIH (TWA) の数値の低い値、もしくは科学的根拠から採用すると決定されているためである。ここで本測定手法は、目標濃度 0.002 mg/m³ (1/1000E) から 4 mg/m³ (2E) 濃度の労働環境大気を対象とし検討を行う事とした。

2. 文献調査

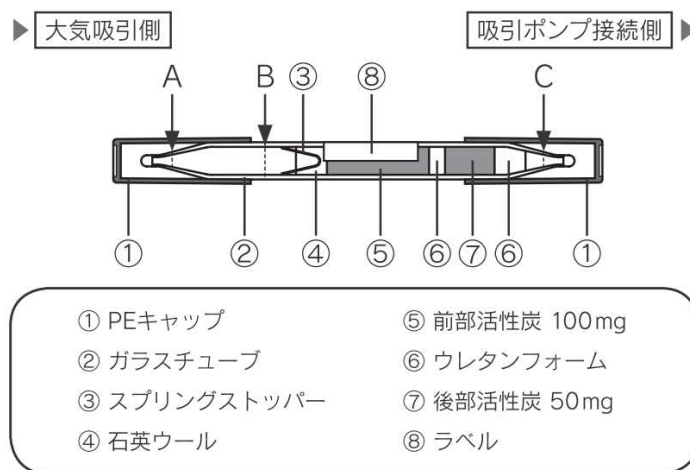
しょう脳測定手法は、NIOSH Manual of Analytical Method 1301 (NIOSH 1301 と略す)、NIOSH 2553 を参考として捕集条件、分析条件、回収率などを確認し検討を行った^{5),6),7)}。NIOSH 1301 は活性炭管捕集にて 1 (v/v)% メタノール二硫化炭素溶液抽出、NIOSH 2553 は活性炭 (石油系) を使用し 3 (v/v)% 2-プロパノール二硫化炭素溶液にて抽出、分析する手法である。また、

DFG (独) 及び HSE (英) では、しよ脳測定法の記述を当方の調査では確認できなかった。

3. 捕集及び分析条件

3-1 捕集条件

NIOSH 1301 の手法を参考に、捕集材は椰子殻活性炭を候補とし、捕集管は充填量 100/50 mg (柴田科学製 図 1) を用いた。これは椰子殻活性炭の比表面積が広いことによる。



※A, B, Cにブリカッティング加工を施しています。

図 1 捕集管構成図⁴⁾

3-2 分析条件

3-2-1 溶媒抽出

捕集管からのしよ脳の溶出には、メタノール (1 (v/v)%) 及びトルエン d8 (0.1 mg/mL) に調整した二硫化炭素溶液を抽出試薬として用いた⁶⁾。溶出は前部及び後部の活性炭を取りだし、バイアルに移し、抽出試薬 1 mL を個別に加え密栓し、室温にて 15 分間振とう (振とう器) して行った。その後、ガスクロマトグラフ用バイアルへ移し入れ GC/MS によって分析した。本手法の抽出試薬は、NIOSH 1301 法による溶媒と同様である。

※ GC/MS 用内標準の検討として当初 p-シメンを検討したが、しよ脳の精油、測定現場に含まれる可能性があり非採用とした。そこで一般的な内標準であるトルエン-d8 を採用し、微極性カラムである HP-5 を用いた。

3-2-2 試薬詳細

- | | | |
|------------|------------------|-----------|
| 1) 抽出溶媒 | 二硫化炭素 (作業環境測定用) | 和光純薬 |
| 2) メタノール | 残留農薬試験用 (500) | 和光純薬 |
| 3) 標準用試薬 | しよ脳 5 mL (GC 標準) | 東京化成 |
| 4) トルエン-d8 | | シグマアルドリッチ |

3-2-3 分析機器測定条件
分析装置の条件を表2に示す。

表2 分析装置条件

ガスクロマトグラフ (質量分析計)	GC/MSD (Agilent)
使用カラム	HP-5MS (Agilent) : 長さ 30 m、 膜厚 0.25 μm 、内径 0.25 mm
試料注入口温度	250 $^{\circ}\text{C}$
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) \rightarrow 《5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 》 \rightarrow 80 $^{\circ}\text{C}$ (0 min) \rightarrow 《20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 》 \rightarrow 250 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)
キャリアガス	He (0.8 mL/min)
試料導入法	Split-less
試料注入量	0.8 μL
MS インターフェイス温度	250 $^{\circ}\text{C}$
MS イオン源温度、検出部温度(QP)	230 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $^{\circ}\text{C}$
m/z	定量イオン ; 69、確認イオン ; 41
キャリアガス	He 0.80 mL/min.

4. ブランク

図2に捕集管からの脱着クロマトの一例を示した。本手法での条件において、抽出試薬及び捕集材からの対象物質と妨害物質は今回認められなかった。

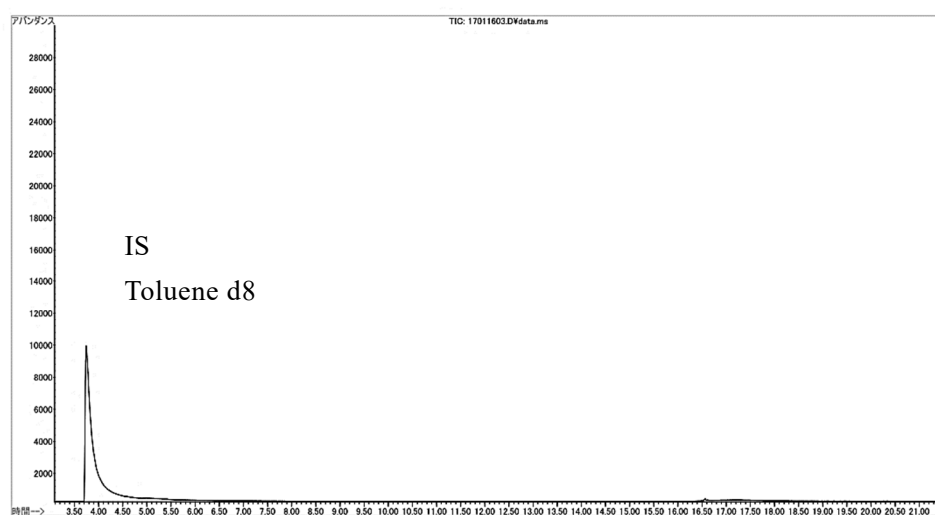


図2 ブランククロマトグラフ

5. 破過

捕集管へ暫定2次評価値の約10倍となるようにしよう脳を二硫化炭素にて調製し、捕集管の前層に添加し、4時間実験室大気を0.1 L/minにて通気した際の結果を表3に記した。本捕集法において、破過は2Eでの条件(24 mg/m³ (4 ppm))において認められなかった。

表3 破過試験結果

前層						後層		
①	②	③	④	⑤	平均	①-⑤	平均	破過率
563.7	545.3	537.4	547.4	542.3	547.3	N.D.	—	0

単位：μg/sample

6. 脱着率

脱着率結果を表4に示す。検討濃度範囲において、平均値96-104%の脱着率を示した。

変動係数も8%以下となった。ここで添加量は、240 min、0.1 L/minにて捕集する場合を想定した。

表4 脱着率測定結果

濃度 (2 mg/m ³)	添加量 (μg/mL)	I	II	III	IV	V	平均値 (%)	中央値	標準偏差(S.D.)	変動係数 (C.V.)
1/1000	0.05	89.1	98.7	100.6	104.0	92.2	96.9	98.7	5.5	5.7
1/100	0.48	98.9	115.7	112.5	97.2	99.5	104.7	99.5	7.7	7.4
1/10	4.75	107.0	99.1	102.7	103.8	105.3	103.6	103.8	2.7	2.6
1	47.50	100.5	97.2	103.1	97.3	119.1	103.5	100.5	8.1	7.9
2	95.00	100.2	99.3	98.7	96.6	103.1	99.6	99.3	2.1	2.1

※内標準物質：トルエン-d8

7. クロマトグラム

しょう腦の標準溶液のMSスペクトルを図3に示す。定量イオンを95.1 m/z、確認イオンを152.1 m/z、81 m/zとする。内標準 (IS : Toluene-d8) は100 m/zを用いた。リテンションタイム (RT) は12.6minを示した。

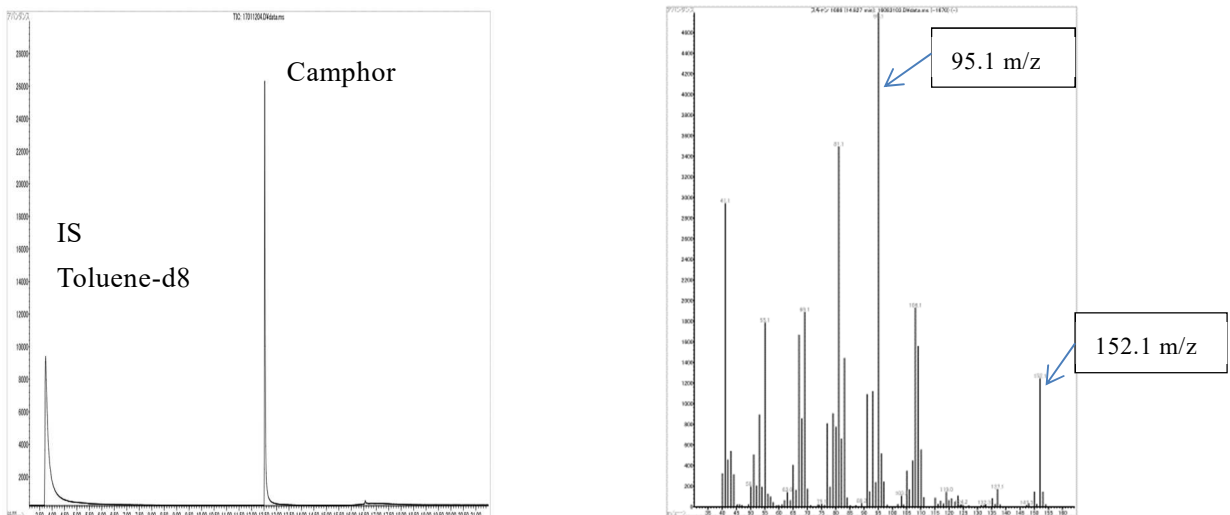


図3 TIC クロマトグラム及びマススペクトル (MS-スペクトル)
(標準溶液、5.7 μg/mL 内標準 Toluene-d8)

7-1 環境中の濃度計算

$$C(\text{ppm}) = c \times V_s \times (24.47/152.26) \times (1/Q) \times (1/\varepsilon)$$

c : 最終試料液濃度 (μg/mL)

Q : 採取吸引量 (L)

ε : 回収率

V_s : 抽出試薬量 (mL)

8. 検量線

しょう腦の検量線は 0.05、0.48、4.75、47.5、95.0 μg/mL の 5 段階の標準系列を抽出試薬にて希釈、調製した。この結果を図 4 に示す。ここから空気濃度換算 (4 時間測定) 値は 0.002 mg/m³ から 4 mg/m³ まで直線性を示した。

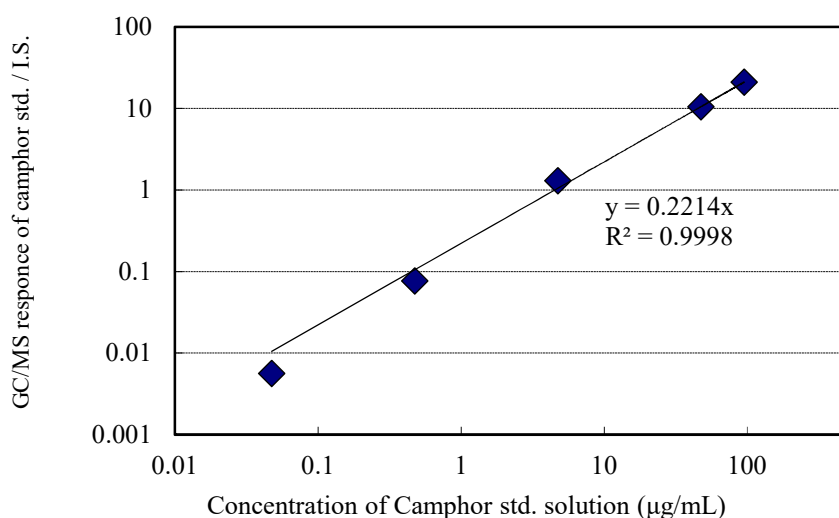


図 4 しょう腦の検量線 (SPLIT 分析)

9. 検出下限及び定量下限

標準溶液 0.03 μg/mL (定量下限値付近濃度) を 5 回分析し、標準偏差 (SD) を算出した。得られた標準偏差から検量線を用い、次式より分析上の検出下限と定量下限を求めた (表 5)。

$$\text{検出下限}(\mu\text{g/mL}) = 3\text{SD}$$

$$\text{定量下限}(\mu\text{g/mL}) = 10\text{SD}$$

これから本手法での分析上の検出下限及び定量下限 (気中濃度) は表 6 に示すとおりとなった。定量下限値より求められる気中濃度は 24 L 採気で約 0.0004 mg/m³ となり、目標濃度 : 0.002 mg/m³ の約 1/5 を示した。よって本測定の目標とする測定範囲において定量が可能であると確認された。

表5 検出下限・定量下限結果

	I	II	III	IV	V	平均	標準偏差 (SD)	検出下限 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	定量下限 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
AREA/I.D.	2.23	2.31	2.09	2.44	2.06	2.22	0.14		
濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.0156	0.0161	0.0146	0.0170	0.0143	0.0155	0.000987	0.121	0.403

(GC/MS: スプリットレス法)

表6 検出・定量下限

溶液濃度	検出下限値 (3SD)	定量下限値 (10SD)
	0.00296 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.00987 $\mu\text{g}/\text{mL}$
24L 採気時の気中濃度 ※	0.121 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.02 ppb)	0.404 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.067 ppb)

※1 mL 脱着とした場合の結果

10. 添加回収率 (通気試験)

10-1 添加試験

回収率は捕集管へしろう脳標準溶液を 1/1000E から 2E 濃度のばく露量となるように添加し、直ちに清浄な室内空気を 0.1 L/min で 240 分間吸引し (25°C、13% (R.H.))、脱着・分析を行い確認した。この結果を表 7 に示す。ここでは表 4 の脱着率と同様に対象測定濃度範囲において約 91.5-106% の結果を得た。これによりしろう脳がばく露測定時間内においても捕集管へ保持され、回収されることが示された。

表7 回収率結果

濃度 (2 mg/m ³)	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	I	II	III	IV	V	平均値 (%)	中央値	標準偏 差(SD)	変動係数 (CV)
1/1000	0.05	109.1	101.3	110.9	107.0	101.6	106.0	107.0	3.9	3.7
1/100	0.48	92.2	94.6	102.6	99.1	96.6	97.0	96.6	3.6	3.7
1/10	4.75	115.8	103.9	—	102.2	96.2	104.5	103.0	7.1	6.8
1	47.50	89.1	90.8	91.1	93.7	92.7	91.5	91.1	1.6	1.7
2	95.00	94.7	93.9	92.7	89.4	92.2	92.6	92.7	1.8	1.9

捕集 : 0.1 L/min×240 min

10-2 ろ紙へ付着した、しろう脳の回収率試験

粒子状のしろう脳は昇華がすばやく行われるため⁸⁾⁹⁾、NIOSH 法では蒸気のみを対象としろ過捕集法を用いていない。本測定手法検討会において個人ばく露測定の場合、発生源の近くにてばく露が行われた場合、粒子状しろう脳にばく露される可能性があるかと推察した。上記の捕集法など固体吸着材のみの場合、微粒子が捕集管を通過してしまう可能性が指摘されている。そこで、ろ過捕集材を捕集管の前段に直列に接続し、粒子状しろう脳をろ過捕集材にて昇華促進し固体吸着材で捕集する方法が提案された。ここでは捕集時にろ過剤から昇華したしろう脳が活性炭管へ移動することを確認した。

試験は、本手法での捕集管吸引口へ「ろ過捕集器」(ろ紙ホルダー: 柴田科学 080140-076) を接続し、ろ過材 (Φ25 T60A20) へしろう脳標準液 (1/1000E) を規定捕集量分添加し、想

定捕集時間である 240 分間清浄空気を通気させた後に、ろ過材、捕集管前部活性炭、及び後部活性炭を抽出分析ししよる脳の移動量を確認した。また、ろ過剤での残留しよる脳の時間変化を知るために、2E 濃度量を上記と同様に添加し、10 分と 240 分間通気をさせた後に比較を行った。

ろ過捕集器に添加した結果を、表 8 に示す。ここからしよる脳はろ過材に少量残留したが、殆ど捕集管（前部）に移動し捕集された。また、図 5 にろ過材での残留しよる脳を示した。ここでは、10 分にて 1/100 に減少し、240 分にて検出限界以下を示した。この減衰曲線を用いてろ過材での残留量を推定すると、240 分間での定積分（捕集濃度は一定と仮定）から、目標濃度の液体標準添加量にたいし 0.25% がフィルター上に残留する計算結果となった。

表 8 昇華性試験 (1/1000E)

	フィルター	前部活性炭	後部活性炭
1	586	2549039	0
(回収率 %)	(0.02)	(91.14)	(0.00)
2	378	2521374	0
(回収率 %)	(0.01)	(90.15)	(0.00)

(しよる脳 : GC/MS area)

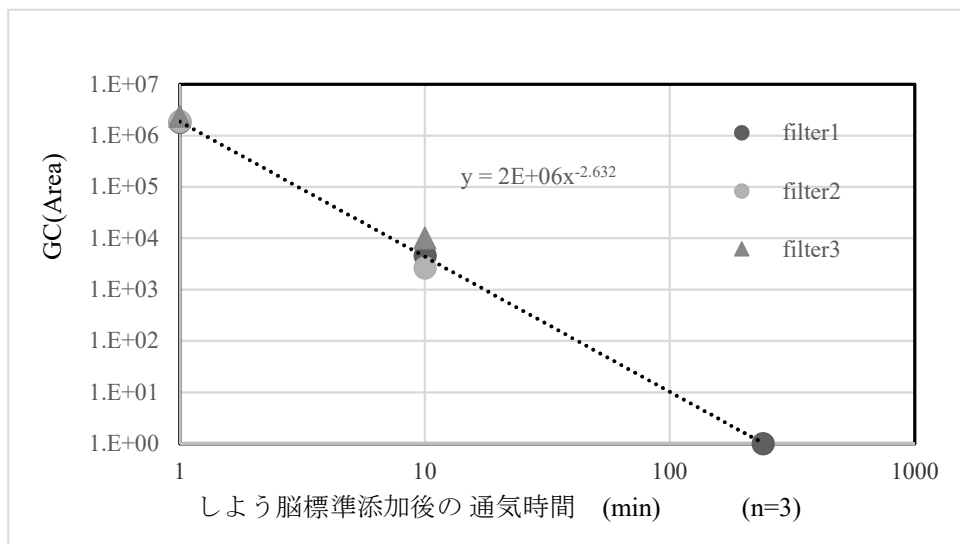


図 5 フィルターへ添加したしよる脳の減衰

11. 保存性

保存性試験のサンプルは 6. 脱着率でのサンプルと同様に、0.1 L/min の流速にて 10 分間室内空気を吸引（常温、常湿）した後、汚染の無い様に両端にキャップをして作成した。このサンプルは冷蔵庫（4℃）にて保存され、直立させた状態で保管された。サンプル作製直後を 0 日目とし、1、3、5 日後に脱着及び分析を行い対象物質の回収状況を確認した。ここでの捕集推定濃度は 1/1000E 及び 2E にて行った。この結果を表 9 に示す。これにより作成した捕集サンプルは 5 日間の冷蔵において安定して保管が可能と示された。

表 9 保管試験結果

添加量	サンプル	0 日目	1 日目	3 日目	5 日目
1/1000E	1	0.0335	0.0367	0.0327	0.0382
	2	0.0344	0.0360	0.0322	0.0360
	3	0.0353	—	—	0.0382
2E	1	89.8	92.5	88.7	86.9
	2	91.1	91.1	92.8	95.2
	3	—	86.7	94.2	93.8

通気時間：0.1 L/min×10 min

(μg)

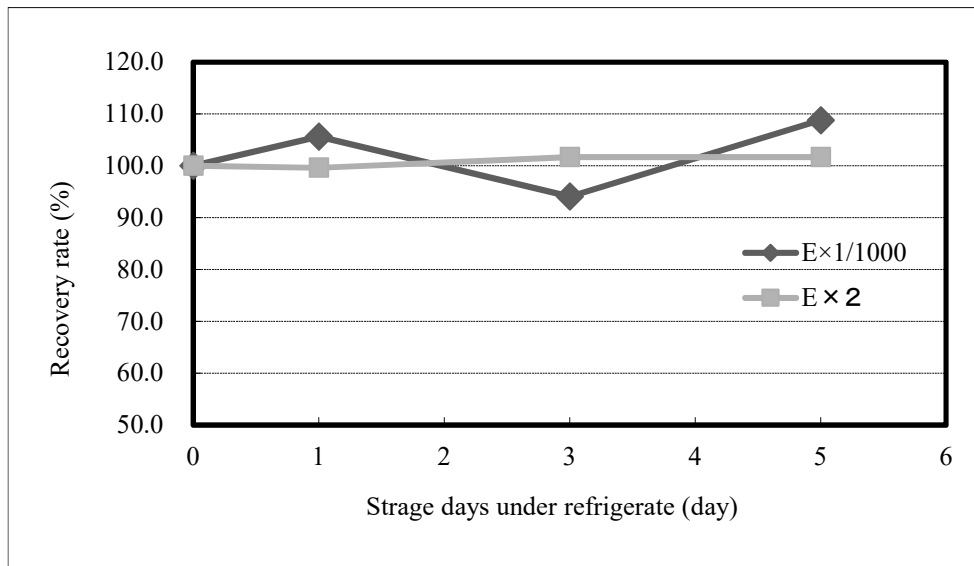


図 6 試料保管試験 (4℃)

12. まとめ

本手法はしょう脳について、 $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ から暫定 2 次目標濃度付近である $4 \text{ mg}/\text{m}^3$ の範囲において、脱着率、回収率、破過試験を検証し、4 時間の個人ばく露捕集が可能であることが示された。また、粒子状のしょう脳を扱う作業場など、粒子状しょう脳へのばく露が予測される場合、活性炭管の前段にろ過捕集器（ろ過材：テフロンバインダーフィルター等が望ましい）を接続する必要があると見られた。この際、ばく露濃度が一定であると仮定した場合、ろ過捕集器での捕集残量は全捕集量に影響を与える量としては少ないと予測された。これはしょう脳の昇華性が高いことによるものである。

13. 検討機関

柴田科学株式会社 開発部（埼玉県草加市中根 1-1-62）

14. 参考文献

- 1) 日本精化株式会社 Web page, <http://www.nipponseika.co.jp/fragrance/camphor.htm>
- 2) 昭和化学(株) SDS DL-しょうのう code 03103250 (平成 26 年 1 月 25 日)
- 3) 東京化成工業株 SDS (±)-Camphor、12、(2016/6)
- 4) 活性炭チューブ Standard type 100/50mg (080150-053) 取扱説明書、柴田科学

- 5) OSHA Toxic and Hazardous Substances, 1910.1000 TABLE Z-1, Limits for Air Contaminants. (March 25, 2016)
- 6) NIOSH 1301; KETONES II, NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition (8/15/94)
- 7) NIOSH 2553; KETONES II, NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition (2003)
- 8) 小野真理子、管野誠一郎、荻原正義、古瀬三也：作業環境における低濃度の発がん性物質の分析法の開発に関する研究、労働安全衛生総合研究所特別研究報告 JNOSH-SRR-NO. 44 (2014)
- 9) 杉本 功、高橋嘉輝：溶媒和物、非晶質固体と医薬品製剤、粉体工学会誌、Vol.22、No.2 (1985)

(別紙) しょう脳標準測定分析法

化学式：C ₁₀ H ₁₆ O	分子量：152.26	CAS No.：76-22-2
許容濃度等： 日本産業衛生学会：なし OSHA TLV：2 mg/m ³ (0.3 ppm) ACGIH TLV(TWA)：2 ppm (12 mg/m ³) ACGIH TLV(STEL)：3 ppm (19 mg/m ³)	物性等 沸点：204℃ 融点：180℃ 蒸気圧：27 Pa/ 0.2 mmHg (20℃) 形状：常温で固体、昇華性物質、特有臭	
別名 (±)-カンファー、2-Camphanone、1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one		
サンプリング		分析
サンプラー：活性炭管 (100/50mg) (柴田科学 No.080150-053) サンプリング流量：0.1 L/min サンプリング時間：4 時間 (24L) 保存性：添加量 0.05、95µg において、冷蔵庫にて 5 日間保管可能 ※ 粒子状のしょう脳を昇華捕集するために、サンプラー前段にテフロンバインダーフィルターを装着し捕集する (推奨)。		分析方法：固体吸着管採取-溶媒抽出法-ガスクロマト質量分析 (GC/MS) 脱着：1% メタノール含有二硫化炭素 1mL 溶出 30 分振とう後、分取 機器：Agilent GC/MSD
精度		分析条件
脱着率；添加量 47.5 µg (2 mg/m ³) 103.5% ; 添加量 0.05 µg (0.002 mg/m ³) 96.9% (0.1 L/min 4 時間として) 回収率；添加量 47.5 µg (2 mg/m ³) 91.5% ; 添加量 0.05 µg (0.002 mg/m ³) 106.0% (0.1 L/min 4 時間として) Split-less (40:1) 検出下限(3SD)：0.1 µg/m ³ (0.02 ppb) 定量下限(10SD)：0.4 µg/m ³ (0.07 ppb)		カラム：HP-5MS (内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm、長さ 30 m) キャリアガス：He、流速 1.0 mL/min スプリットレス分析 オープン温度：40℃(2 min hold)-5℃/min-80℃-20℃/min-250℃(3min) 注入口温度：250℃ 質量分析計温度：250/230/150℃ (Transfer/ion-source/Q-pole) 定量イオン(m/z)：152.1(定量)、100(内標) 注入量：0.8 µL リテンションタイム(RT)：12.6 min 検量線：0.03-60 µg/mL の範囲で直線性が得られている。 定量法：内標準添加法 Toluene-d8
適用：個人ばく露測定、作業環境測定		
参考：NIOSH1301, 2553 (NMAM)		
妨害：確認されていない		
参考文献		
1) 日本精化株式会社 Web page, http://www.nipponseika.co.jp/fragrance/camphor.htm 2) 昭和化学(株) SDS DL-しょうのう code 03103250 (平成 26 年 1 月 25 日) 3) 東京化成工業株 SDS (±)-Camphor、12、(2016/6) 4) 活性炭チューブ Standard type 100/50mg (080150-053) 取扱説明書、柴田科学 5) OSHA Toxic and Hazardous Substances、1910.1000 TABLE Z-1、Limits for Air Contaminants. (March 25, 2016) 6) NIOSH 1301; KETONES II (1994) 7) NIOSH 2553; KETONES II (2004) 8) 小野真理子、管野誠一郎、荻原正義、古瀬三也：作業環境における低濃度の発がん性物質の分析法の開発に関する研究、労働安全衛生総合研究所特別研究報告 JNOSH-SRR-NO. 44 (2014) 9) 杉本 功、高橋嘉輝：溶媒和物、非晶質固体と医薬品製剤、粉体工学会誌、Vol.22、No.2 (1985)		

作成日：平成 30 年 2 月 16 日