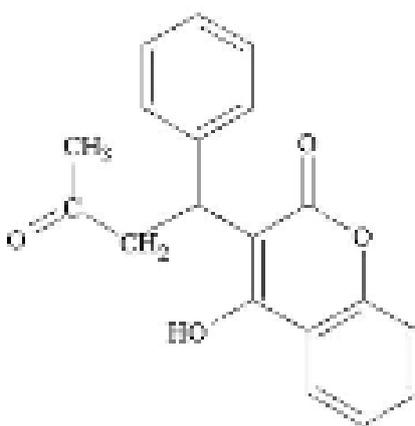


3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンの
測定・分析手法に関する検討結果報告書

1. はじめに

表1に物理化学的性状および許容濃度を示す¹⁾。外観は白色の結晶性粉末であり、光分解が有るとされている²⁾。溶解性は水に難溶であり、アセトン、メタノールおよびエタノールに可溶である。

表1 3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンの物理化学的性状

CAS No.	81-81-2	
別名	ワルファリン	
用途	農薬(殺鼠剤) 医薬品(血液抗凝固薬)	
構造式		
分子量	308.33	
物性	比重	データなし
	沸点	沸点以下で分解
	融点	161
	蒸気圧	133 Pa (106 mmHg)、9.1 Pa (68 mmHg)
	形状	白色結晶
許容濃度等	日本産業衛生学会	未設定
	OSHA	PEL-TWA 0.1 mg/m ³
	NIOSH	REL-TWA 0.1 mg/m ³
	ACGIH	TLV-TWA 0.1 mg/m ³

ばく露防止および保護措置における管理濃度は現在未設定であり、許容濃度は日本産業衛生学会が未設定、ACGIHはTLV-TWA 0.1 mg/m³に設定している³⁾。そこで、気中濃度としてTLV-TWA 0.1 mg/m³の1/1000から2倍の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、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンの測定およびその分析方法に関する公定法としてNIOSH Manual of Analytical methods 5002が示されている⁴⁾。捕集方法は、PTFEメンブレンフィルタ(孔径1 μm)を用いたろ過捕集方法が採用されており、HPLC(UV280 nm)で分析している。

3. 捕集および分析条件

3-1. 試薬

検討には表2に示す試薬を使用した。

表2 試薬詳細

試薬名	メーカー	グレード	純度	Cat.No
ワルファリン標準物質	和光純薬工業(株)	残留農薬試験用	99.0%	236-02441
リン酸	和光純薬工業(株)	特級	85.0%	167-02166
メタノール	和光純薬工業(株)	HPLC用	99.7%	132-06471

1) 3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準原液

ワルファリン標準物質(和光純薬工業製)を100mg秤量し、メタノールで溶解の後、全量10 mLに定容し1%の標準原液とした。なお、この標準原液は褐色バイアル瓶で密閉し冷蔵保存(4)する。

2) 3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液

検量線作成および溶液添加に用いる標準溶液は、標準原液をメタノールで適宜希釈し調製した。なお、この標準溶液は褐色バイアル瓶で密閉し冷蔵保存(4)する。

3) HPLC溶離液

NIOSH Manual of Analytical methods 5002は、0.0025 Nリン酸水溶液 30%、メタノール70%のアイソクラテック溶離を採用している。0.0025Nリン酸水溶液は0.0068%となる。本検討ではリン酸水溶液を調製し易い0.01%とした。0.01%リン酸水溶液は、10%リン酸水溶液1 mLに純水を加え、全量1000 mLに定容し調製した。溶離液は、0.01%リン酸水溶液 300 mL、メタノール700 mLを混合し調製した。

3-2. 捕集方法

捕集ポンプはSKC製AirChek2000を使用した。サンプラーはメルク製PTFEメンブレンフィルタ(1 μ m、 ϕ 25 mm、Omnipore Membrane Filter、JAWP02500)を用いた。検証試験は、フィルタへの溶液添加により行った。フィルタに溶液を添加した際に、溶液がフィルタの裏まで浸透し、結晶が生成して脱落する可能性があるため、実験はフィルタ2枚をカセット型ホルダへ取り付けに行った(図1-1)。なお、今回使用したカセット型ホルダは、PTFEメンブレンフィルタとホルダ間に隙間が生じて固定できなかったため、ガラス繊維ろ紙(ϕ 25 mm、厚さ0.7 mm)をカットしてシール材に用いた(図1-2)。

図2に添加回収率(通気試験)の操作フローを示す。3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液は、許容濃度の1/1000、1/50、2倍濃度になるようフィルタの1層目に直接添加し、数分間静置し溶媒を気化させた。その後、室内空気を1 L/minで240分間通気した。通気後は、フィルタを取り出し褐色ネジ口瓶に入れ密閉保管した。抽出は褐色ネジ口瓶にメタノール2 mLを添加し、キャップをして超音波抽出を1分間行い、この溶液を試料溶液とした。



図 1-1 サンプラー取り付け写真



図 1-2 ガラス繊維ろ紙シール材

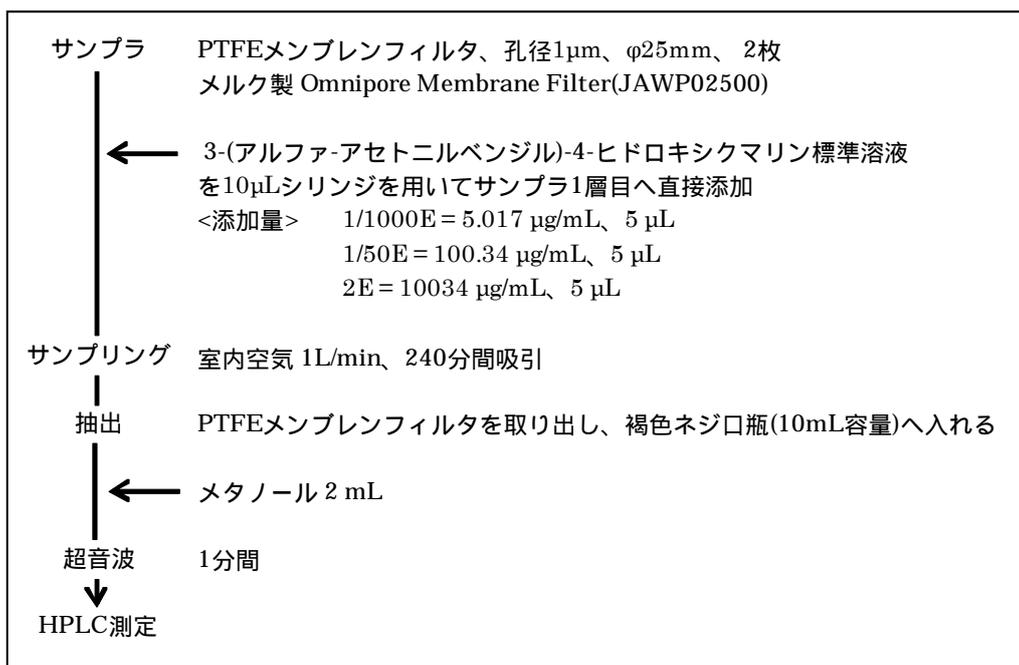


図2 添加回収率(通気試験)の操作フロー

3-3 . 分析条件

装置および分析条件を表3に示す。装置は、日立ハイテクサイエンス製の高速液体クロマトグラフChromasterを使用した。カラムは、充填剤にフェニルブチル基を有するLaChrom Ph (日立ハイテクサイエンス製)を採用した。

表3 装置および分析条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
カラム	LaChrom Ph (4.6 mm I.D., \times 150 mmL、5 μ m) P/N 891-5068 日立ハイテクサイエンス製
溶離液	0.01%リン酸/メタノール = 30/70
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40
検出器(DAD)	測定波長 280 nm / バンド幅 10 nm (波長範囲 200 ~ 400 nm) 応答速度 1 s、収集間隔 400 ms
試料注入量	25 μ L

4 . ブランク

ブランク確認は、未使用のPTFEメンブレンフィルタを褐色ネジ口瓶に2枚入れ、メタノールを2 mL添加し、超音波抽出(1min)を行った。ブランク溶液は5検体調製し、HPLCで測定した。図3にブランク溶液のクロマトグラムを示す。確認に供したフィルタからは、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンピークの保持時間に重なる夾雑成分の溶出は認められなかった。

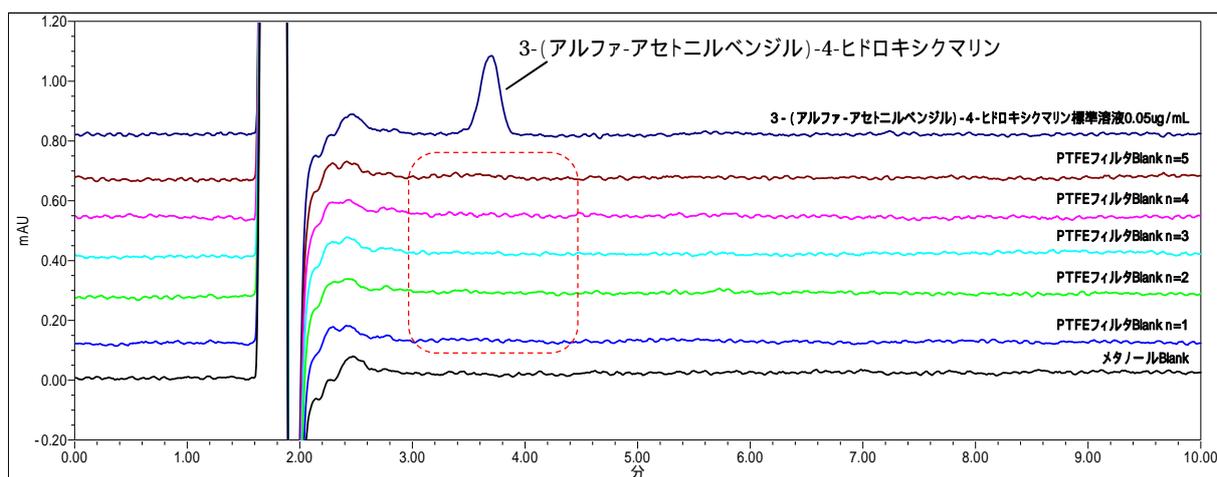


図3 ブランク溶液(n=5)のクロマトグラム

(保持時間確認：3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液 0.05 µg/mL)

5. 光分解の確認

サンプリングによる3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンの光分解を確認した。カセット型ホルダにフィルタを取り付け(図1-1)、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液を許容濃度の1/1000、1/50、2倍濃度になるようフィルタ1層目に直接添加した。カセット型ホルダをアルミホイルで蔽い、遮蔽の有無による光分解を比較した。サンプリング操作は、添加回収率(通気試験)の操作フロー(図2)に準じて行った。図4、表4に光分解試験結果を示す。高濃度(1/50E、2E)の場合、遮蔽の有無による回収率の変化は見られなかった。低濃度(1/1000E)は、遮蔽有り97.8%、遮蔽無しは89.0%となり、回収率が8.8%低下した。この結果より、以降の確認からはサンプラーをアルミホイルで遮蔽する事とした。

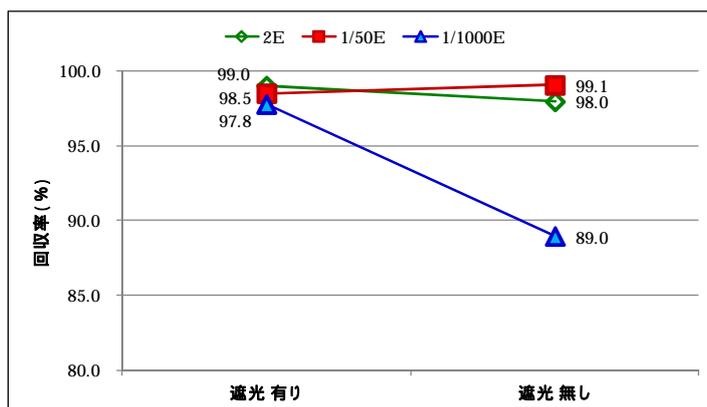


図4 遮蔽の有無による光分解比較

表4 光分解試験結果(n=3) 室温26.7~28.5、湿度30.0~41.4%

捕集量 (L)	添加量 (µg)		遮光	サンプル数	定量値 (µg)	回収率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
240	0.0251	1/1000E	有り	(n = 3)	0.0245	97.8	3.13	3.20
			無し		0.0223	89.0	2.86	3.21
	0.50	1/50E	有り		0.49	98.5	2.16	2.19
			無し		0.50	99.1	1.23	1.24
	50.2	2E	有り		49.7	99.0	1.02	1.03
			無し		49.2	98.0	4.76	4.86

6. 破過

フィルタの破過試験は、許容濃度の2倍濃度になるように3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液(10034 µg/mL) 5 µLをフィルタの1層目に直接添加し、数分間静置して溶媒を気化させた。サンプリング操作は、図2の添加回収率(通気試験)操作フローに準じて行った。抽出は、フィルタ1層目、2層目を別々の褐色ネジ口瓶に入れ、メタノール2 mLを添加

した。表5に破過試験結果を示す。蒸気圧が9.1Paであるため、蒸発による損失が起こる可能性があるが、全て1層目に保持されていることが確認された。

表5 破過試験結果(n = 2) 室温26.7 ~ 28.5 、湿度30.0 ~ 41.4%

No	捕集量 (L)	添加量 (μg)		1層目		2層目	
				定量値(μg)	回収率(%)	定量値(μg)	回収率(%)
1	240	50.2	2E	50.0	99.7	0.000	0.0
2				50.2	100.0	0.000	0.0

7. 脱着率

脱着率試験は、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液を、許容濃度の1/1000、1/50、2倍濃度になるようにフィルタ1層目に直接添加し、数分間静置し溶媒を気化させた。その後、室内空気を1 L/minで10分間通気した。通気後は、フィルタを取り出し褐色ネジ口瓶に入れて密閉し、冷蔵(4)で一晩安定させた。その後、抽出(図2参照)を行いHPLCで測定した。表6に脱着率試験結果を示す。脱着率は98.9から99.8%であり、全ての水準において90%以上を示した。

表6 脱着率試験結果(n = 5) 室温26.7 ~ 28.5 、湿度30.0 ~ 41.4%

捕集量 (L)	添加量 (μg)		サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
10	0.0251	1/1000E	(n = 5)	0.0248	99.0	2.14	2.16
	0.50	1/50E		0.50	98.9	0.59	0.60
	50.2	2E		50.1	99.8	0.97	0.97

8. クロマトグラム

3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液のクロマトグラムおよびスペクトルを図5に示す。

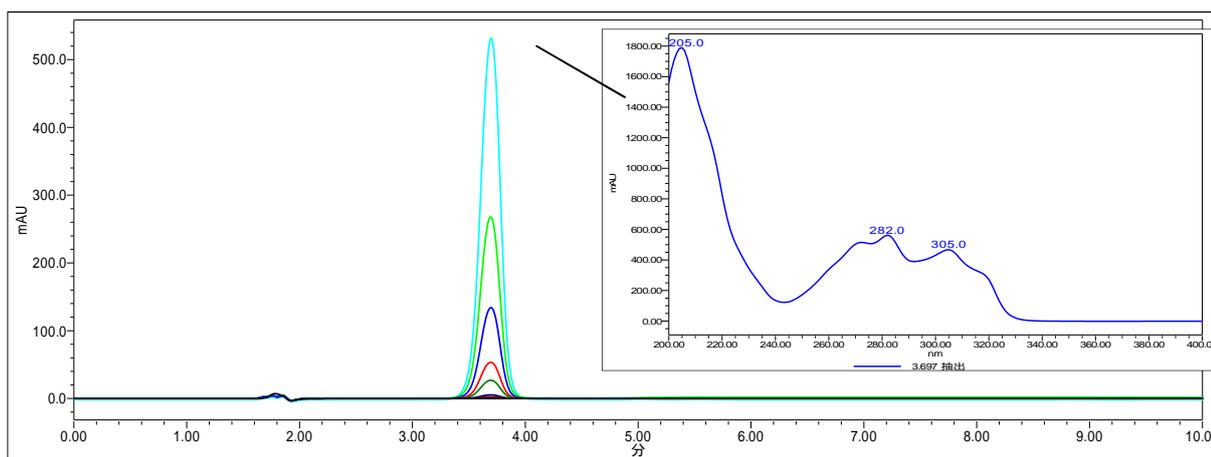


図5 3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液(0-100 μg/mL)のクロマトグラム重ね書きおよびスペクトル

9. 検量線

検量線は、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液をメタノールで希釈し、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、25、50、100 μg/mLの11段階の標準系列を調

製し、直線性を確認した。表7にピーク面積値、図6には検量線を示す。検量線は0.005～0.5 μg/mLの低濃度および0.005～100 μg/mLの広範囲濃度において、相関係数(R²)は1.0000を示し、良好な直線性が得られた。

表7 ピーク面積値

濃度 (μg/mL)	面積値
0.000	0
0.005	311
0.010	636
0.050	3276
0.100	6741
0.500	33281
1.000	65688
5.000	334831
10.00	662659
25.00	1665894
50.00	3331061
100.0	6632662

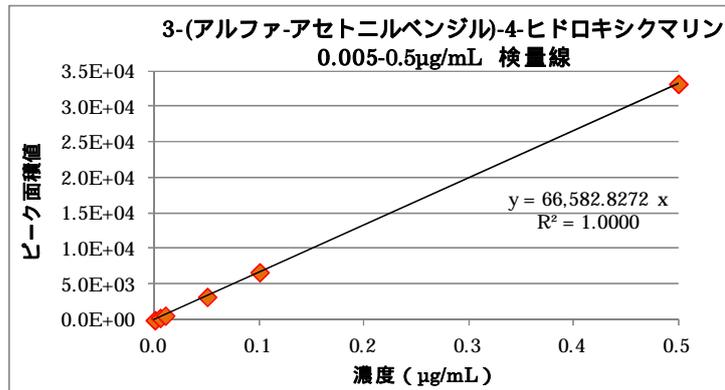


図 6-1 検量線(0.005-0.5 μg/mL)

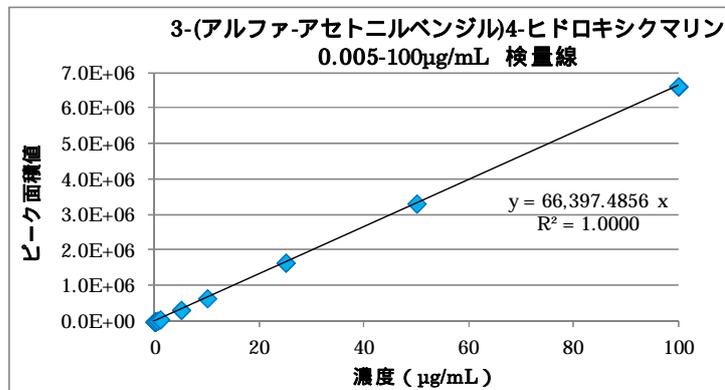


図 6-2 検量線(0.005-100 μg/mL)

10. 検出下限および定量下限

3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液0.05 μg/mL (1 L/minで240分間通気した場合の気中濃度は0.00042 mg/m³、許容濃度の1/240倍に相当)を6検体測定し、定量値から検出下限値(3σ)および定量下限値(10σ)を求めた。繰り返し測定による定量値の変動係数は1.054%、検出下限値は0.0016 μg/mL、定量下限値は0.0052 μg/mLであった。定量下限値より求められる気中濃度は、240 L通気(最終溶液量2 mL)で0.000043 mg/m³であり許容濃度の1/2308となった(表8)。

表8 検出下限値および定量下限値

	検出下限値(3σ)	定量下限値(10σ)
溶液濃度(μg/mL)	0.0016	0.0052
240 L通気による気中濃度 (mg/m ³)	0.000013	0.000043

< 計算式 >

$$\text{気中濃度 (mg/m}^3\text{)} = \frac{\text{定量下限値濃度 (}\mu\text{g/mL)} \times \text{最終試料液量 (mL)}}{\text{吸引空気量 (L)}}$$

1.1. 添加回収率(通気試験)

添加回収率(通気試験)は、図2の添加回収率(通気試験)操作フローに準じて行った。3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液は、許容濃度の1/1000、1/50、2倍濃度になるように、フィルタの1層目に直接添加した。表9に添加回収率(通気試験)結果を示す。回収率は97.8~99.0%であり、全ての水準において90%以上であることを確認した。

表9 添加回収率(通気試験)結果(n = 3) 室温26.7~28.5、湿度30.0~41.4%

捕集量 (L)	添加量 (μg)		サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
	0.0251	1/1000E					
240	0.0251	1/1000E	(n=3)	0.0245	97.8	3.13	3.20
	0.50	1/50E		0.49	98.5	2.16	2.19
	50.2	2E		49.7	99.0	1.02	1.03

1.2. 保存性

保存性試験は、3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準溶液を、許容濃度の1/1000、1/50、2倍濃度になるようにフィルタ1層目に直接添加した。数分間静置し溶媒を気化させた後、室内空気を1L/minで240分間吸引し通気した。通気後は、フィルタを取り出し褐色ネジ口瓶に入れて密閉し、冷蔵(4℃)で保存した。保存日数は、通気直後の0日目を基準とし、1、3、7日後に抽出(図2)を行いHPLCで測定した。表10、図7に保存性試験結果を示す。いずれの濃度、日数においても保存率は90%以上を示し、7日間保存できることを確認した。

表10 保存性試験結果(n=5) 室温26.7~28.5、湿度30.0~41.4%

添加量0.025μg (1/1000E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
240	0	(n=5)	0.0246	97.9	100.0	2.15	2.19
	1		0.0236	94.0	96.0	1.14	1.21
	3		0.0233	92.9	94.9	1.27	1.37
	7		0.0236	94.1	96.1	1.23	1.30
添加量0.50μg (1/50E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
240	0	(n=5)	0.50	99.3	100.0	1.21	1.22
	1		0.50	98.8	99.5	1.03	1.04
	3		0.49	98.0	98.7	1.27	1.29
	7		0.49	97.7	98.4	1.45	1.48
添加量50.2μg (2E)							
捕集量 (L)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	回収率 (%)	保存率 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
240	0	(n=5)	49.9	99.4	100.0	0.80	0.81
	1		49.8	99.3	99.9	0.82	0.82
	3		49.3	98.2	98.8	1.07	1.09
	7		48.9	97.4	98.0	1.01	1.04

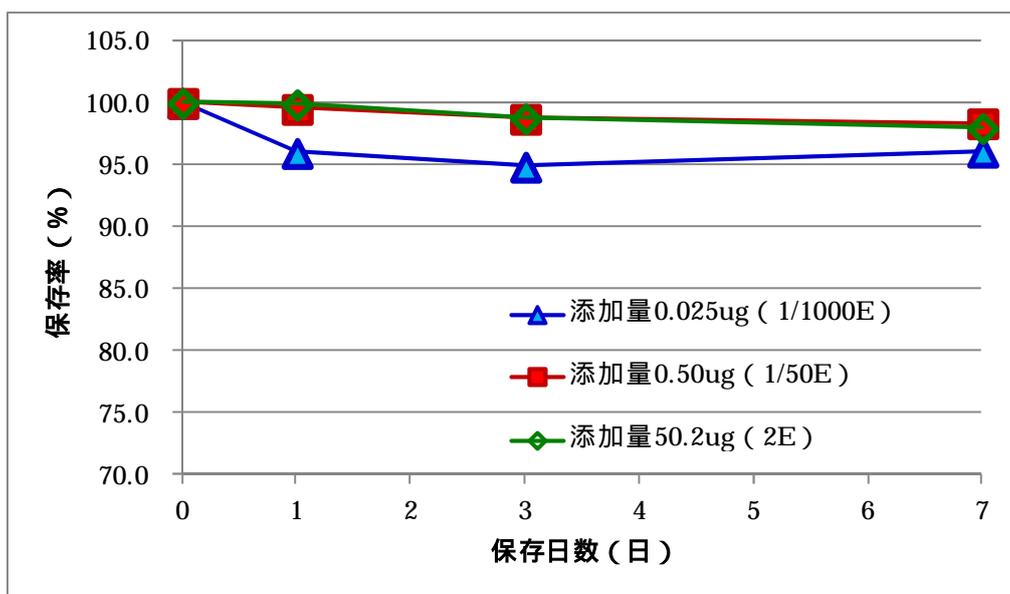


図7 0-7日間の保存安定性試験結果

13. まとめ

本検証実験では2枚のフィルタを使用した。実験結果が示すように、検証濃度範囲では3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリンの蒸発による損失は認められなかった。従って、捕集はPTFEメンブレンフィルタ(1 μ m)1枚で行うことができる。

本法は、個人ばく露測定手法としてTLV-TWA 0.1 mg/m³ (ACGIH) の1/1000から2倍となる0.0001 ~ 0.2mg/m³の濃度範囲を良好に分析できる手法であることが確認できた。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。

14. 参考文献

- 1) GHSモデルラベル・SDS情報 製品安全データシート「3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン」2006年9月11日改定、厚生労働省、
入手先<<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/0643.html>> , 参照2014/12/5 .
- 2) 箕輪佳子ほか, 東京都健康安全研究センター研究年報, 58別冊, 2007 .
- 3) 日本産業衛生学会, 2005、ACGIH, 2005 .
- 4) NIOSH (1994), Manual of Analytical Methods No.5002, WARFARIN .
<<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5002.pdf>>

(別紙) 3-(アルファ-アセトニルベンジル)-4-ヒドロキシクマリン標準測定分析法

化学式：C ₁₉ H ₁₆ O ₄		分子量：308.33		CASNo：81-81-2	
許容濃度等： ACGIH TLV - TWA：0.1 mg/m ³ OSHA PEL - TWA：0.1 mg/m ³ 日本産業衛生学会：未設定			物性等 沸点： 沸点以下で分解 融点： 161 蒸気圧： 9.1 Pa(21) 形状： 結晶性粉末		
別名		ワルファリン			
サンプリング			分析		
サンプラー： PTFEメンブレンフィルタ (1μm,φ25mm)1枚、JAWP02500(メルク(株) 製) サンプリング流量：1.0 L/min サンプリング時間：4時間(240L) 要遮蔽 保存性： 添加量0.025 μg、0.5 μg、50.2 μg において、冷蔵で少なくとも7日間までは変 化がない事を確認			分析方法： 高速液体クロマトグラフ法 抽出溶液： メタノール2mL(HPLC用) 抽出操作： 超音波抽出1分間 標準溶液： 3-(アルファ-アセトニルベンジ ル) -4-ヒドロキシクマリンをメタノールで溶解		
精度			分析条件：		
脱着率； 添加量0.025 μgの場合 99.0% 0.5 μg 98.9% 50.2 μg 99.8%			機器： Chromaster (株)日立ハイテクサイエンス製 カラム： LaChrom Ph (4.6 mmI.D.×150mmL,5 μm)、P/N891- 5068 (株)日立ハイテクノロジーズ製		
回収率； 添加量 0.025 μgの場合 97.8% (4時間) 0.5 μg 98.5% 50.2 μg 99.0%			カラム温度： 40 移動相： 0.01%リン酸水溶液/メタノール =30/70 流速： 1.0mL/min 検出器： UV280nm 試料注入量： 25μL		
定量下限 (10σ) 0.0052 μg/mL 0.000043 mg/m ³ (採気量； 240 L) 検出下限 (3σ) 0.0016 μg/mL 0.000013 mg/m ³ (採気量； 240 L)			検量線： 0.005から100μg/mLの範囲で直線 性が得られている 定量法： 絶対検量線法		
適用：					
妨害：					
1) GHSモデルラベル・SDS情報 製品安全データシート「3-(アルファ-アセトニルベンジ ル)-4-ヒドロキシクマリン」2006年9月11日改定、厚生労働省、 入手先< http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/0643.html >、参照2014/12/5。 2) 箕輪佳子ほか、東京都健康安全研究センター研究年報、58別冊、2007。 3) 日本産業衛生学会、2005、ACGIH、2005。 4) NIOSH (1994), Manual of Analytical Methods No.5002, WARFARIN。 < http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5002.pdf >					

作成日：平成27年 2月25日