

(別紙②)

1-ブロモブタン標準測定分析法

構造式: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$	分子量: 137.02	CAS No.109-65-9
許容濃度等: OSHA 設定されていない NIOSH 設定されていない ACGIH 設定されていない	物性等 比重: 1.28 BP: 101.6°C VP: 40hPa (20°C)	
別名 臭化 n-ブチル(n-Butylbromide)		
サンプリング		分析
サンプラー: TENAX-TA (SUPELCO) サンプリング流量: 0.1L/min 採気量: 0.5~1L 保存性: 冷蔵(4°C)3日間保存において問題なし ブランク: 検出せず		分析方法: 加熱脱着ガスクロマトグラフ質量分析法 (ATD/GC/MS) 機器: PerkinElmer TurboMass Gold Turbo Matrix ATD
精度		
捕集率(通気試験における回収率) 0.1L/min × 10min ①添加量 0.5 μg; 平均回収率 85% ②添加量 6.0 μg; 平均回収率 86%		<GC部> カラム: DB-5MS 内径 0.25mm × 膜厚 0.25 μm × 長さ 60m インターフェース温度: 250°C 昇温: 40°C(2min) → 10°C/min → 100°C(2min) → 20°C/min → 150°C キャリアガス: He 1mL/min
検出下限(3σ) 0.0023 μg 定量下限(10σ) 0.0076 μg (0.010 μg の標準液繰り返し 5 回測定)		<MS部> イオン化法: EI イオン化電圧: 70eV 測定モード: SIM 測定質量数(m/z) 対象物質: 定量イオン 57 確認イオン 136, 138 測定サイクル: 0.3s/cycle
定量下限(気中濃度) 0.0027ppm(v/v) (採気量を 0.5L として) 0.0014 ppm(v/v) (採気量を 1L として) ※1L を超える採気量は低濃度域における回収率の低下を生ずる		<加熱脱着部> 脱着温度: 280°C(8min) トラップ温度: -30°C → 40°C/s → 320°C 流量: 入口スプリット 30mL/min、出口スプリット 10mL/min、脱着 30mL/min (スプリット比 22:1)
		検量線 0 μg 0.01 μg 0.05 μg 0.10 μg 0.20 μg 0.50 μg 1.0 μg 2.0 μg 4.0 μg 6.0 μg 8.0 μg 分析時のリテンションタイム 対象物質: 9.1min
参考: 化学物質分析法開発調査報告書(1989): 1,5-ジブロモペンタン他: 環境省 化学物質分析法開発調査報告書(1997): 2-ブロモプロパン他: 環境省 川崎市公害研究所年報(1999): 1-ブロモブタン他: 川崎公害研究所		

作成日 平成 22 年 2 月 26 日

2- アミノ-4-クロロフェノール分析測定法に関する検討結果

平成 22 年 2 月 26 日

測定・分析手法検討チーム
中央労働災害防止協会

目 次

目 的

1. 文献調査

2. 予備試験

2-1. HPLC 条件

2-2. 溶媒の選択

3. 本試験

3-1. 方法

3-1-1. 試薬の調製

3-1-2. 分析操作

3-2. 結果

3-2-1. 保存安定性

3-2-2. 捕集時間

3-2-3. 検量線

3-2-4. 検出下限及び定量下限

4. まとめ

5. 参考文献

6. 検討実施者

目的

2-アミノ-4-クロロフェノールは、医薬品、写真薬及び染料の中間体などに使用されているが、変異原性が認められたことから、化学物質による労働者の健康障害防止に係るリスク評価の対象物質となった。しかし、現在のところ作業環境測定手法は示されていない。そこで、作業環境測定手法を確立するための検討を行ったので報告する。

1. 文献調査

アミノクロロフェノールの測定法に関する文献を表1に示す。環境水を HPLC により分析した報文はあるが、大気測定に関する文献はない。

表1 アミノクロロフェノールの測定法に関する文献

出典	対象物質	対象媒体	脱着溶媒	測定装置
AOAC Journal of AOAC International 2007/5/1	2-アミノ-4-クロロフェノール	環境水	なし	HPLC-UV
産業医学 Jpn J Ind Health 1992;34:126-30	2-アミノ-5-クロロフェノール	尿	なし	HPLC-UV

2. 予備実験

2-1. HPLC 条件

2-アミノ-4-クロロフェノールはC18 カラムでも保持が弱い。従って出来るだけ保持させるために溶離液には、アセトニトリルではなくメタノールを用いて0.2%リン酸水溶液との比を15:85%(v/v)とし、カラムには長さ250mmのものを使用した。表2に分析条件を示す。

表2 HPLC 分析条件

分析条件	
装置	Agilent1100 シリーズ
カラム	Waters Puresil 5 μ C18 120A 4.6 \times 250mm
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流量	1ml/min
注入量	20 μ l
検出器	UV
検出波長	227nm
移動層	メタノール/0.2%リン酸水溶液=15/85

上記の条件で10 μ g/mlの2-アミノ-4-クロロフェノール標準液を分析した時の、クロマトグラム及びスペクトルを図1に示す。

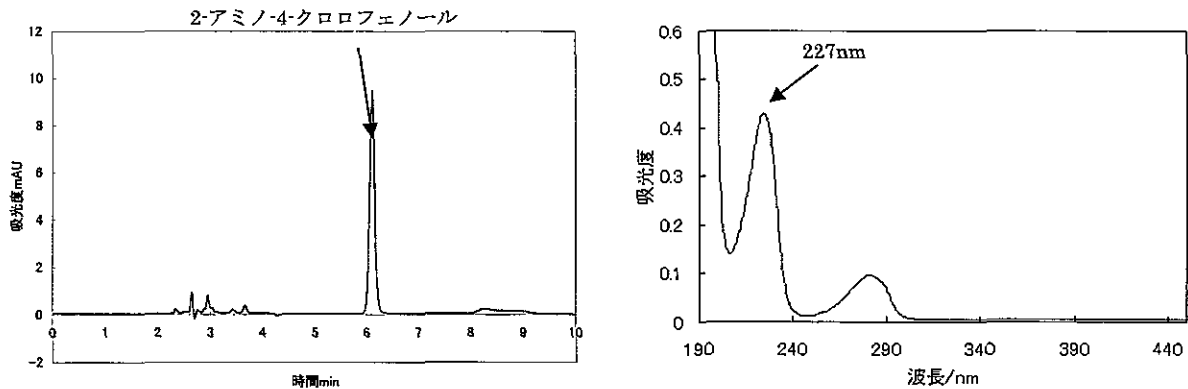


図1 2-アミノ-4-クロロフェノールの分析クロマトグラムおよびUV吸収スペクトル

2-2. 溶媒の選択

2-アミノ-4-クロロフェノールを8種類の溶媒で $1\mu\text{g/ml}$ の試料液を調製し、HPLC測定して得られたクロマトグラム上のピークを比較した。その結果を表3に示す。水を除きほぼ同等のピーク面積が得られた。ただし、メタノール100%では注入したメタノールによる溶出効果が起こり、ピークがブロードになった。

表3 HPLC測定ピーク面積の比較

試料溶媒	ピーク面積の相対強度
水	80
2%アスコルビン酸	92
0.02Mリン酸	100
2%アスコルビン酸+0.02Mリン酸	94
0.5M硫酸	95
2%アスコルビン酸+0.5M硫酸	100
15%(v/v)メタノール	99
100%メタノール	100

(各試料を測定して得られたクロマトグラム上のピークのうち、最大のものを100とした。)

次に2-アミノ-4-クロロフェノール溶液の保存安定性を調べるための実験を行った。8種類の溶媒で標準液を調製し、当日調製した溶液に対する、10日間冷暗所で保存した溶液のピーク面積の割合を求めた。その結果を表4に示す。水及びアスコルビン酸溶液以外は良好な結果となった。そこで、保存安定性が良くHPLCの移動層の組成と同じであることから、15%(v/v)メタノール及び85%(v/v)0.5M- H_2SO_4 水溶液の混合溶液を脱着溶媒とした。

また、この結果から、捕集剤に硫酸またはリン酸を含浸させることにより、捕集時に2-アミノ-4-クロロフェノールを安定化する可能性を見出した。

表4 試料液の保存安定性

試料溶媒	$\frac{10 \text{ 日間保存した試料液のピーク面積}}{\text{当日調製した標準液のピーク面積}} \times 100 (\%)$
水	65
2%アスコルビン酸	22
0.02M リン酸	97
0.5M 硫酸	97
15% (v/v) メタノール	98
100%メタノール	93
2%アスコルビン酸+0.02M リン酸	96
2%アスコルビン酸+0.5M 硫酸	98

3. 本試験

3-1 方法

3-1-1 試薬の調製

a) 標準物質

2-アミノ-4-クロロフェノール(東京化成工業株式会社 純度 98%以上)

メタノール(関東化学株式会社製 HPLC 用)

リン酸(和光純薬工業株式会社製 特級)

b) 標準液

2-アミノ-4-クロロフェノール 100mg に 15% (v/v) メタノール-85% (v/v) 0.5M-H₂SO₄ 水溶液を加えて溶解後、100ml メスフラスコで定容し、1000mg/L の標準溶液を調製する。これを順次希釈して各濃度の標準液を調製する。

3-1-2 分析操作

a) 捕集剤

硫酸含浸フィルター

(SKC 社製 No. 225-9012; ガラス繊維ろ紙を 0.13M H₂SO₄ メタノール溶液 1ml に含浸後、局所排気装置内で乾燥したもの、又は 0.13M H₂SO₄ 水溶液 1ml に含浸後、100°C で乾燥したもの)

b) 脱着方法

捕集剤の 1 層目のろ紙を取り出し、15% (v/v) メタノール-85% (v/v) 0.5M-H₂SO₄ 水溶液を 10ml 加え、攪拌後 20 分間超音波洗浄機にかけて抽出する。脱着液は捕集フィルター繊維による濁りを除くために、耐メタノール・耐酸性のある孔径 0.45 μm のフィルター (アドバンテック DISMIC 13CP045AN など) によりろ過後、HPLC で測定する。

3-2 結果

3-2-1 保存安定性

2-アミノ-4-クロロフェノール溶液を直接添加した捕集剤を保存し、安定性を調べた。2種類の濃度(10、1000 $\mu\text{g/ml}$)の標準液100 μl を直接捕集剤のろ紙に添加し、0、1、3、6日間冷暗所で保存した後、脱着し試験液を測定した。表5に結果を示す。

表5 保存安定性

保存日数	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)
0	1	93 \pm 13	100	97 \pm 7.9
1		95 \pm 8.0		98 \pm 2.6
3		88 \pm 4.5		100 \pm 3.2
6		94 \pm 12		90 \pm 3.5

6日保存したのも回収率が90~94%となり、良好な結果が得られた。

3-2-2 捕集時間

捕集時間の増加に伴う回収率低下を調べるための試験を行った。3種類の濃度(10・100・1000 $\mu\text{g/ml}$)の標準液100 μl を直接捕集剤のろ紙に添加し、室温で0.5~1時間放置(自然乾燥)後、1L/min及び5L/minでそれぞれ10分間、60分間、300分間、室内空気(温度:20~22 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度:40~60%)を通気し、その後脱着したものを測定し回収率を調べた。表6にその結果を示す。5L/minの通気では、低濃度、高濃度ともに通気時間の増加とともに回収率が低下する傾向が認められた。低濃度では10分間の通気においても回収率が低下した。一方、1L/minでも類似の傾向が見られたが、10minの通気ではいずれの濃度においても良好な回収率であった。なお、1L/minの通気で回収率の低下がみられた60及び300分間通気した試料の2層目のフィルターを分析したところ、その回収率が1%以下であったことから考えて、通気による回収率の低下は2-アミノ-4-クロロフェノールが1層目から脱離して後段へ抜けたことによるものではなく、長時間の通気により何らかの変質または分解が生じたことによるものである可能性が推察される。

表6 捕集時間

a) 通気速度 1L/min

通気時間(min)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)
10	1	86 \pm 5.6	10	80 \pm 2.6	100	81 \pm 6.8
60		65 \pm 4.8		75 \pm 8.0		80 \pm 9.7
300		11 \pm 2.9		40 \pm 7.8		79 \pm 11

b) 通気速度 5L/min

通気時間(min)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)	添加量 (μg)	回収率% (mean \pm SD)
10	1	67 \pm 8.0	10	79 \pm 3.2	100	94 \pm 9.2
60		28 \pm 11		32 \pm 5.9		65 \pm 16
300		14 \pm 8.9		31 \pm 9.3		49 \pm 10

表7 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 標準液の繰り返し測定結果

測定No.	濃度 (ng/ml)
1	0.09768
2	0.09898
3	0.09753
4	0.09768
5	0.09798
6	0.09738
7	0.09663
8	0.09783
9	0.09753
10	0.09678
平均	0.09760
SD	0.0006493
3 σ	0.001948
10 σ	0.006493

表8 検出下限値 (LOD) および定量下限値 (LOQ)

試料液濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		5L 採気時の濃度 (ppb(v/v))		10L 採気時の濃度 (ppb(v/v))	
LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
0.006	0.02	2	6	1	3

4. まとめ

検量線、装置の検出下限、定量下限、保存安定性は良好であった。捕集時間（通気試験）に対しては低濃度ほど回収率が低下する傾向があるが、通気速度 1L/min では 10 分間の通気においても良好な回収率であった。しかし、捕集効率が不明であること、採気時間を長くできないことなどの課題もあり、インピンジャーを用いた液体捕集方法についても検討を行う余地がある。

5. 参考文献

- (1) AOAC Journal of AOAC International 2007/5/1
- (2) 産業医学 Japanese Journal of Industrial Health, 1992, 34, 126-130

6. 検討実施者

田村 三樹夫（上越環境科学センター）

3-2-3 検量線

0、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$ の5濃度を測定し得られた検量線の直線性の検討を行った。検量線を図2に示す。直線性は良好で、相関係数1.0000であった。

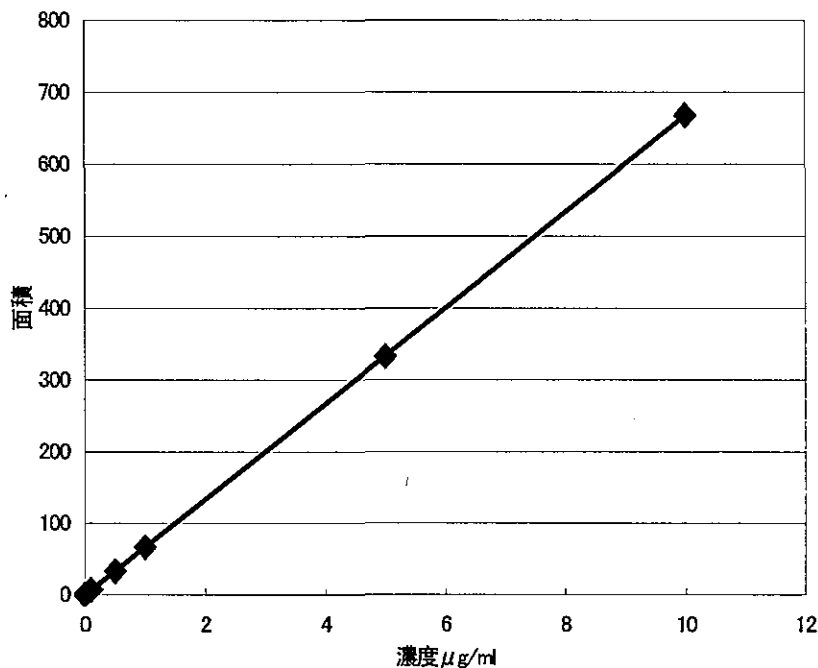


図2 検量線

3-2-4 検出下限・定量下限

検量線の最低濃度の標準液(0.1 $\mu\text{g/ml}$)を10サンプル測定した結果を表7に示す。得られた標準偏差から、その3倍を検出下限値 (LOD)、10倍を定量下限値 (LOQ) とした結果は、LODが0.0019 $\mu\text{g/ml}$ 、LOQが0.0065 $\mu\text{g/ml}$ となった。しかし、測定結果のバラつきが非常に小さかったため、計算上は LOD 0.0019 $\mu\text{g/ml}$ 、LOQ 0.0065 $\mu\text{g/ml}$ となるが、実際のクロマトグラフ上でピークとして判定することが困難である。そこで、分析上で現実的に認識可能なS/N比を3とした時のLODを0.006 $\mu\text{g/ml}$ 、10とした時のLOQを0.02 $\mu\text{g/ml}$ とし、その場合に計算される5L及び10L採気時のLOD、LOQを表8に示す。

2-アミノ-4-クロロフェノール標準測定分析法

構造式: $C_6H_3(OH)(NH_2)Cl$ 分子量: 143.6 CAS No. 109-65-9	
許容濃度等: TWA 設定されていない MAK 設定されていない	物性等 融点: 140°C 引火点: 170°C 発火温度: 500°C 溶解度(水): 0.3mg/100ml (20°C) 蒸気圧: 0.2Pa (25°C) log Pow: 1.24
別名 5-クロロ-2-ヒドロキシアニリン	
サンプリング	分析
サンプラー: 硫酸含浸フィルター (SKG社製 No. 225-9012) サンプリング流量: 1L/min 採気量: 10L	高速液体クロマトグラフ法 脱着: 15% (v/v) メタノール+85% (v/v) 0.5M-H ₂ SO ₄ 水溶液: 10ml 機器: Agilent1100 シリーズ 使用カラム: Waters Puresil 5 μ C18 120Å 4.6×250mm
精 度	カラム温度: 40°C 流量: 1ml/min 注入量: 20 μ l 検出器: UV 検出波長: 227nm ※224~228nm で良好な吸収波長を選択して行う 移動層: メタノール/水/リン酸=15/85/0.2 検量線: 絶対検量線法 0 μ g/ml 0.1 μ g/ml 0.5 μ g/ml 1.0 μ g/ml 5.0 μ g/ml 10 μ g/ml 分析時のリテンションタイム: 6.1min
保存性: 冷蔵 (4°C) において 6 日間安定 通気試験 1L/min×10min 通気時の回収率 1 μ g 添加時: 86% 10 μ g 添加時: 80% 100 μ g 添加時: 81% (※10min を超える捕集は低濃度における回収率低下を生ずる) 検出下限: 0.006 μ g/ml (計算上 3 σ は 0.0019 μ g/ml) 定量下限: 0.02 μ g/ml (計算上 10 σ は 0.0065 μ g/ml) ※計算上の値は実際のクロマトグラム上でピークとして判定することが困難であったため、ピークの S/N=3 を検出下限、10 を定量下限とした。 定量下限 (気中濃度): 3ppb (v/v) (1L/min×10min 通気において)	
妨害: 未確認である	
備考: 捕集効率が不明、採気時間を長くとれないなどが課題である	
参考: AOAC Journal of AOAC International 2007/5/1 産業医学 Jpn Ind Health 1992;34:126-130	

作成日 平成 22 年 2 月 26 日