

アジピン酸の測定手法検討結果

1. 目的

アジピン酸の ACGIH TLV-TWA は $5\text{mg}/\text{m}^3$ である。本検討では TLV-TWA の $1/1000\sim 2$ 倍相当の範囲における測定・分析手法について検討した。

2. アジピン酸の物性等

表 1 にアジピン酸の物性¹⁾ および許容濃度²⁾、図 1 に構造式を示す。

表 1 物性および許容濃度

物質名	アジピン酸
別名	ヘキサン二酸 1,4-ブタンジカルボン酸
化学式	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
分子量	146.14
CAS番号	124-04-9
外観	無色、無臭の結晶性粉末
密度	1.36g/mL
沸点	338°C
融点	152°C
蒸気圧	10Pa (18.5°C)
溶解性(水)	1.4g/100mL (15°C) 溶ける
オクタノール/水分配係数	log Pow = 0.08
許容濃度	ACGIH TLV-TWA = $5\text{mg}/\text{m}^3$ (ACGIH 2007)

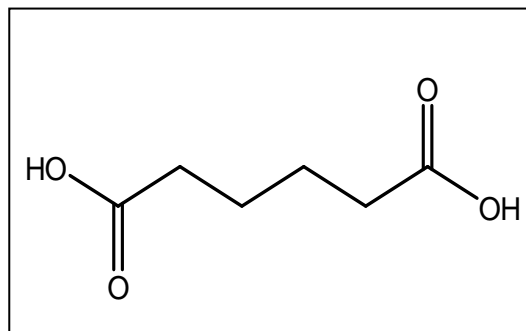


図 1 構造式

3. 分析方法に関する文献調査および予備検討

アジピン酸の分析方法は OSHA にて示されており GC-FID が用いられているが、本検討では HPLC を使用した分析方法を検討した。

アジピン酸はカルボキシル基が存在するため、 $200\sim 210\text{nm}$ の吸収を利用した HPLC-UV 直接検出法による予備検討をおこなった。測定条件を表 2 に示す。アジピン酸の極大吸収波長は 210.0nm 、定量下限値 (S/N=10) は $0.548\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、HPLC-UV 直接検出法では十分な感度が得られないことから個人ばく露濃度の測定には適さないと考えた。

表 2 HPLC-UV 直接検出法の測定条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
カラム	LaChrom C18-AQ (4.6mm.I.D., $\times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$)
溶離液	$1\text{mmol}/\text{L H}_2\text{SO}_4 + 8\text{mmol}/\text{L Na}_2\text{SO}_4 (\text{pH}2.8)$ / アセトニトリル = 20/80
流速	$1.0\text{mL}/\text{min}$
カラム温度	40°C
DAD検出器	210nm 波長範囲 $200\sim 400\text{nm}$
試料注入量	$50\mu\text{L}$

そこで、アジピン酸のカルボキシル基に発蛍光団を導入するプレカラム法を検討した。プレカラム誘導体化試薬には脂肪酸分析用蛍光試薬である ADAM (9-アンスロニルジアゾメタン)³⁾ を用い、HPLC-FL による測定をおこなった。

捕集剤は、(株)日立ハイテクノロジーズ製の NOBIAS RP-SG1WA (大気捕集用) を使用した。

4. 分析方法

4-1. 試薬

検討には表 3-1 に示す試薬を使用した。

表 3-1 試薬詳細

試薬名	メーカー	グレード	純度
アジピン酸	和光純薬工業(株)	特級	99.5%
ADAM(9-アンスロニルジアゾメタン)	フナコシ(株)	-	-
酢酸エチル	和光純薬工業(株)	HPLC用	99.8%
メタノール	和光純薬工業(株)	HPLC用	99.7%
アセトニトリル	関東化学(株)	HPLC用	99.8%

1) アジピン酸標準原液

アジピン酸を 200mg 秤量しメタノールで 10mL に定容した。この標準原液中のアジピン酸濃度は 20000 μ g/mL である。

2) アジピン酸標準溶液

検量線および標準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。

3) ADAM 反応溶液の調製

ADAM を酢酸エチルで溶解し 0.1% (w/v) になるよう調製した。なお、ADAM 反応溶液は用時調製とした。

4-2. 分析条件

HPLC-FL による測定条件を表 4 に示す。

表 4 装置および測定条件

装置	日立高速液体クロマトグラフ Chromaster			
カラム	LaChrom C18 (4.6mm.I.D., × 150mmL, 5 μm)			
溶離液	(A)アセトニトリル			
	(B)H ₂ O			
	(C)アセトニトリル/酢酸エチル=90/10			
グラジエントタイムプログラム	時間(min)	%A	%B	%C
	0.0	81.0	19.0	0.0
	15.0	81.0	19.0	0.0
	15.1	0.0	0.0	100.0
	25.0	0.0	0.0	100.0
	25.1	81.0	19.0	0.0
45.0	81.0	19.0	0.0	
流速	1.0mL/min			
カラム温度	40℃			
蛍光検出	Ex=365nm、Em=412nm			
	PMT電圧=Super Low			
試料注入量	20 μL			

4-3. プレカラム誘導体化方法

ADAM (9-アンスロニルジアゾメタン) は脂肪酸分析用蛍光試薬であり、脂肪酸などのカルボン酸と反応し強い発蛍光性のエステルを生成する (図 2-1)。生成したエステルの蛍光は、メタノールまたはアセトニトリル中で励起波長 365nm、蛍光波長 412nm の特性を有する⁴⁾。

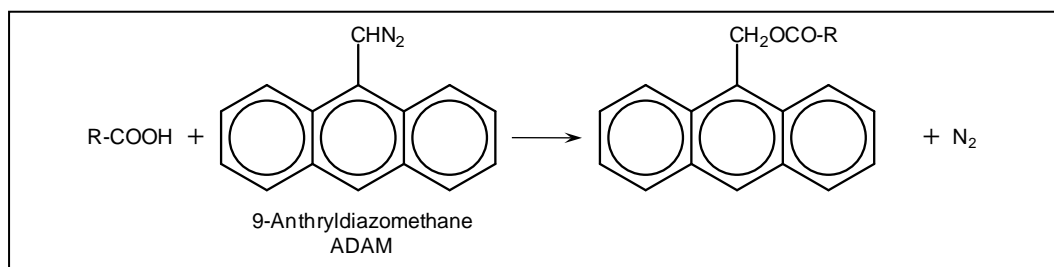


図 2-1 ADAM とカルボン酸の蛍光誘導体化反応

(出典:フナコシ(株)HP、脂肪酸分析用蛍光試薬、ADAM 情報)

アジピン酸の ADAM 誘導体化による反応時間を確立するため、ADAM 添加直後から 50 分毎に測定し確認した (図 2-2)。反応は ADAM 添加後から 300 分経過で安定することから、室温 (25℃) で 5 時間以上静置する事とした。これらの検討結果より誘導体化手順を以下の通りに決定した。

1) 誘導体化手順

- ①アジピン酸標準溶液 0.5mL を HPLC 測定用褐色バイアル瓶 (2mL) に移しいれ、ADAM 反応溶液 0.5mL を添加する。
- ②ボルテックスミキサを用い 30 秒程度攪拌する。
- ③室温 (25℃) で 5 時間以上静置し反応させる。

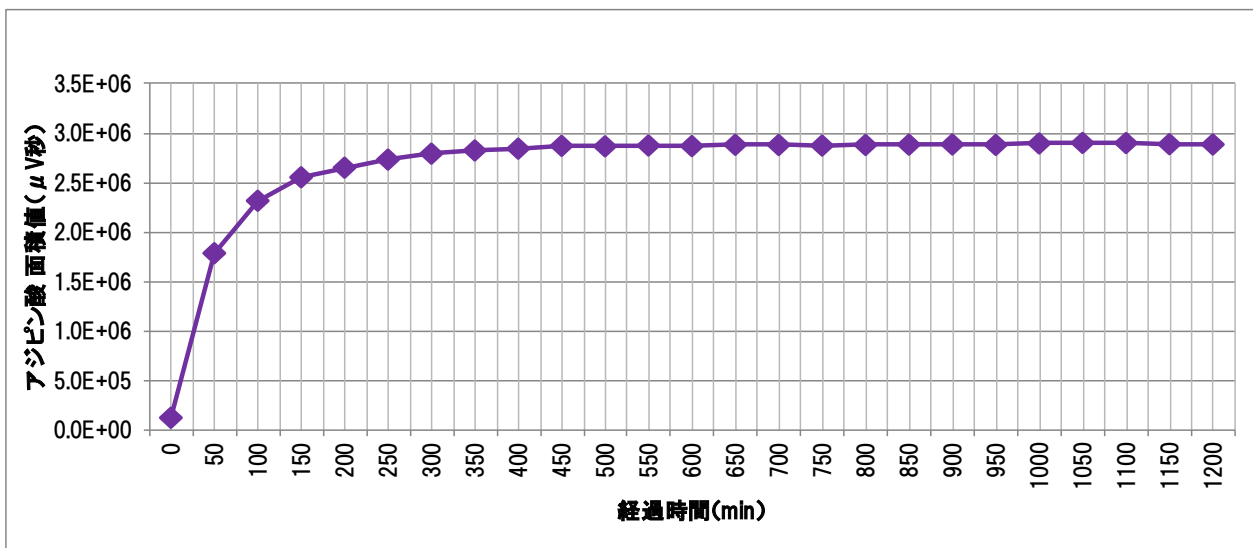


図 2-2 アジピン酸の ADAM 誘導体化反応

4-4. 捕集条件

捕集ポンプは Air Check 2000 (SKC 製) を用いた。

捕集剤は、(株)日立ハイテクノロジーズ製の NOBIAS RP-SG1WA 大気捕集用 (以下、SG1WA) を使用した。SG1WA の形状はコマ形であり、ジビニルベンゼンメタクリレート共重合体が 440mg 充填されている (表 5、図 3 参照)。



図 3 NOBIAS RP-SG1WA 外観

表 5 捕集剤の詳細

品名	メーカー	形状 材質	充填剤 充填量	フィルタ
NOBIAS RP-SG1WA (大気捕集用)	日立ハイテク	コマ形 ポリプロピレン	ジビニルベンゼンメタクリレート共重合体 440mg	高密度ポリエチレンフリッツ

脱着方法は、SG1WA のインレット部に注射筒タイプのリザーバを接続し、アウトレット部には 10mL 試験管をセットする。脱着溶媒はメタノール 5mL を使い、約 1mL/min の流速で完全に通液後、試験管の目盛りで 5mL に定容した。

5. 検討結果

5-1. 検量線の直線性確認

アジピン酸 ADAM 誘導体標準溶液 0-100 μg/mL 範囲を測定し検量線の直線性を確認した。表 6 にピーク面積値、図 4 に検量線を示す。直線範囲は 0-10 μg/mL であり相関係数 (R²) は 0.9994 であった。

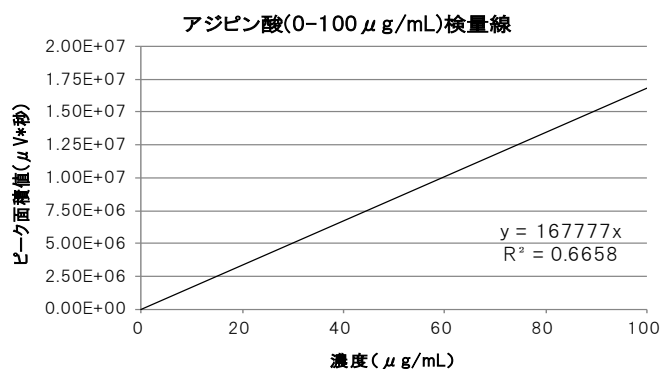


表 6 ピーク面積値

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	ピーク面積値
0.00	0
0.05	28814
0.10	46148
0.50	217439
1.00	435416
5.00	2258040
10.00	4736921
25.00	10434683
50.00	13110232
100.00	12476649

図 4-1 検量線(0~100 $\mu\text{g/mL}$)

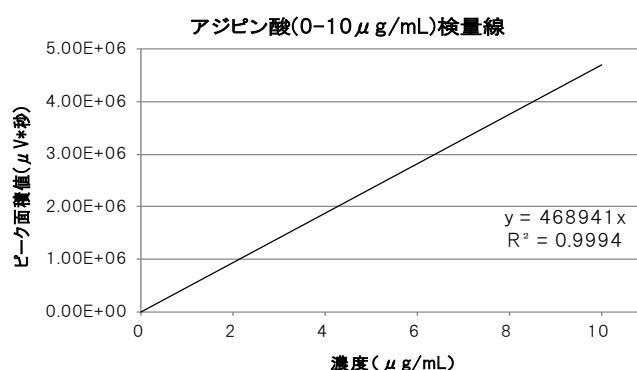


図 4-2 検量線(0~10 $\mu\text{g/mL}$)

図 5 にアスピリン酸 ADAM 誘導體標準溶液の検量線範囲 (0、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラム重ね書きを示す。

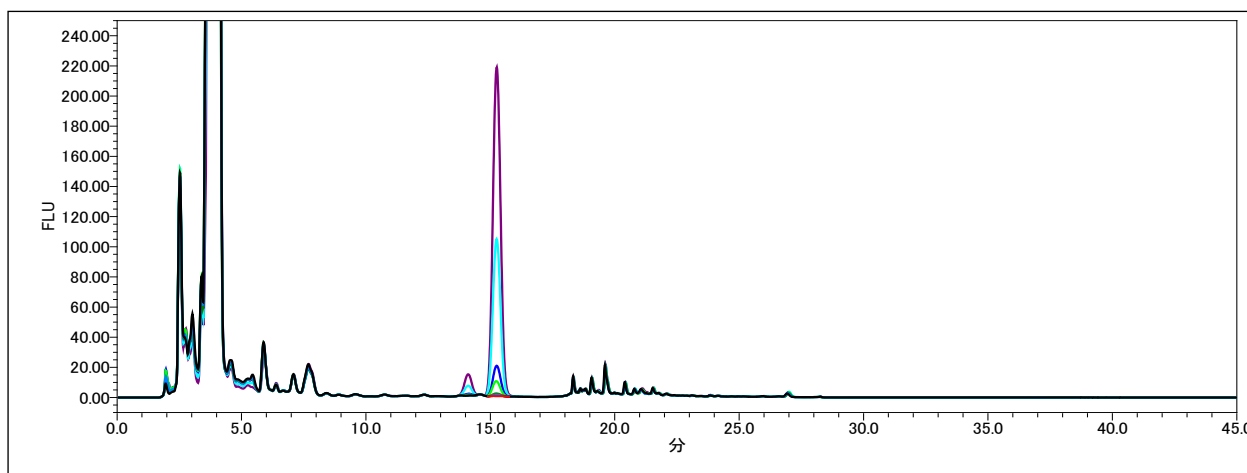


図 5-1 アスピリン酸 ADAM 誘導體標準溶液(0、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$)の
クロマトグラム重ね書き

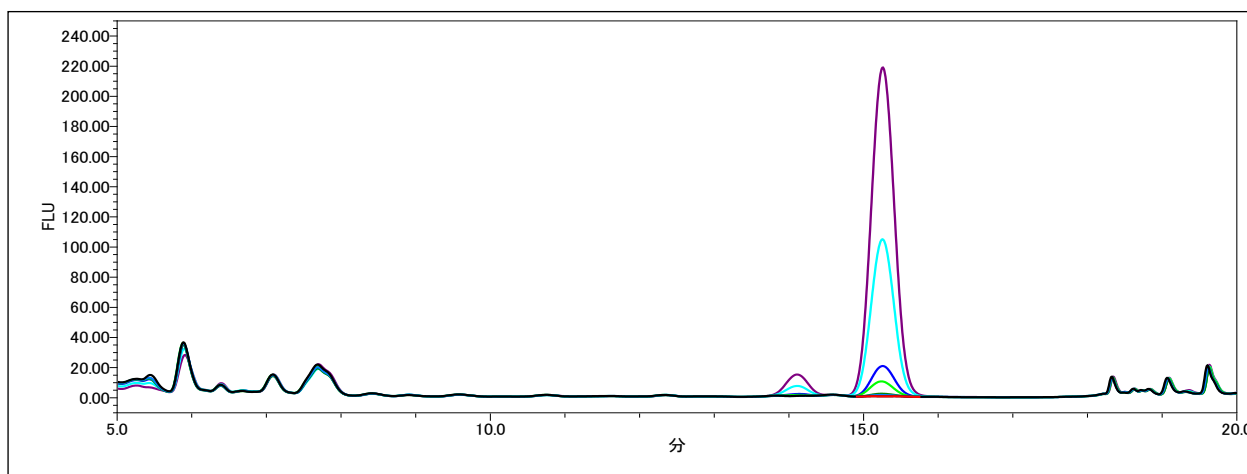


図 5-2 アスピリン酸 ADAM 誘導體標準溶液(0、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$)の
クロマトグラム重ね書き(スケール拡大図)

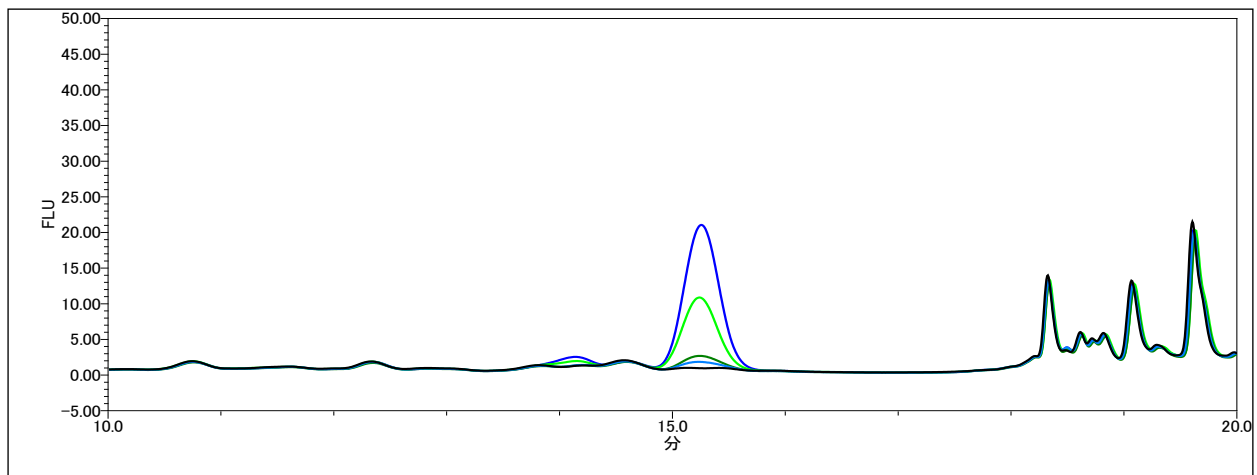


図 5-3 アジピン酸 ADAM 誘導体標準溶液(0、0.05、0.1、0.5、1 μg/mL)の
クロマトグラム重ね書き(スケール拡大図)

5-2. 検出下限値および定量下限値の確認

気体の捕集量を 10L (1L/min、10min) とし、TLV-TWA (5mg/m³) の 1/100 (0.05mg/m³) に相当するアジピン酸 ADAM 誘導体標準溶液 0.1 μg/mL を 5 検体作製し 5 回繰り返し分析を行った。結果のピーク面積値より標準偏差の 3 倍を検出下限濃度、10 倍を定量下限濃度として算出した(表 7-1)。変動係数は 1.5%、検出下限値 (3σ) は 0.0045 μg/mL、定量下限値 (10σ) は 0.0152 μg/mL であった。

表 7-1 検出下限値および定量下限値

	面積値 (μV秒)	平均	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)	検出下限値(3σ) (μg/mL)	定量下限値(10σ) (μg/mL)
繰り返し分析 1回目	51928	51386	710.5	1.4	0.0045	0.0152
繰り返し分析 2回目	51879					
繰り返し分析 3回目	50244					
繰り返し分析 4回目	51146					
繰り返し分析 5回目	51733					

<計算式> 検出下限値: $3\sigma/a$ 直線 検量線 $ax + b$
 定量下限値: $10\sigma/a$ $a = 468941x$
 $b = 0$

表 7-1 の定量下限値 (10σ) より、捕集剤から溶媒脱着後の最終液量を 5mL とし、気体の捕集量を変化させた場合の気中濃度定量下限値を算出した(表 7-2)。捕集量 10L (1L/min、10min) の気中濃度定量下限値は 0.0076mg/m³、捕集量 240L では 0.0003mg/m³ であった。

表 7-2 気中濃度定量下限値

捕集量 (L)	通気流量 (L/min)	捕集時間 (min)	最終液量 (mL)	アジピン酸 定量下限値 ($\mu\text{g/mL}$)	気中濃度 定量下限値 (mg/m^3)
10	1.0	10	5	0.0152	0.0076
20		20			0.0038
60		60			0.0013
120		120			0.0006
240		240			0.0003
480		480			0.0002

<計算式>

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

5-3. ブランク確認

脱着溶媒および SG1WA のブランク確認をおこなったところ、アジピン酸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 6)。

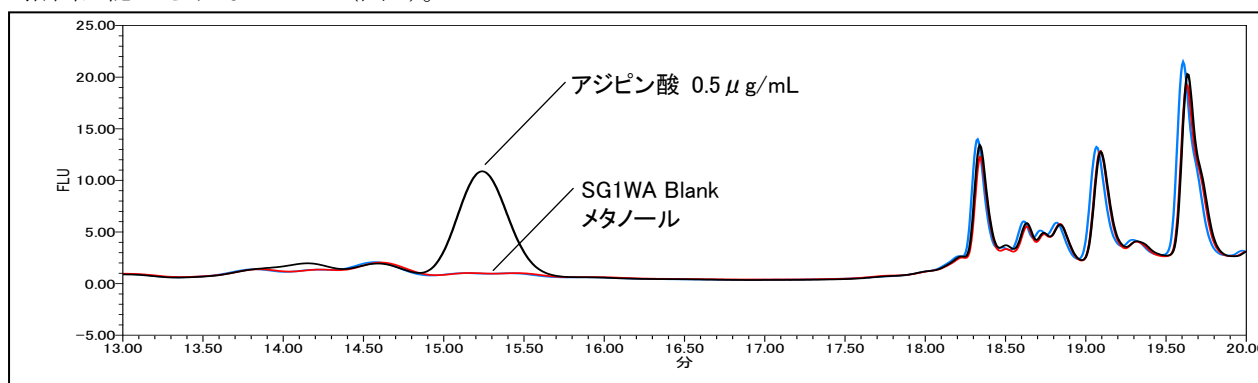


図 6 脱着溶媒および捕集剤ブランクのクロマトグラム

5-4. 破過

(保持時間確認 : アジピン酸 ADAM 誘導体標準溶液 $0.5 \mu\text{g/mL}$)

SG1WA を 2 個連結し、1 層目のインレット側フィルタ部にアジピン酸標準溶液 $2005 \mu\text{g}$ 添加した。その後、室内空気を流量 1L/min で 4 時間吸引し、溶媒脱着、ADAM 誘導体化、測定をおこない 2 層目への破過の有無を確認した。表 8 に破過確認の結果を示す。室内空気を 4 時間通気させてもアジピン酸の 2 層目への破過は生じなかった。

表 8 破過確認結果

通気流量 (L/min)	時間 (h)	通気量 (L)	液量 (mL)	添加量 (μg)	サンプル数	1層目	2層目
						回収率平均(%)	
1.0	4	240	5	2005	(n=2)	99.7	N.D.

室温 $20.4 \sim 22.3^\circ\text{C}$

湿度 $21.5 \sim 22.5\%$

脱着溶液はメタノールで40倍希釈しHPLC-FLにて測定

5-5. 脱着率

脱着率は、TLV-TWA (5mg/m^3) の $1/1000$ (0.005mg/m^3) から 2 倍 (10mg/m^3) 相当の空気を 1L/min で 4 時間吸引した場合の捕集絶対量を算出し、その範囲の量となるようにアジピン酸標準溶液を調製し、

SG1WA のインレット側フィルタ部に添加した。添加量は 1、50、2005 μg であり、4 時間吸引した場合の気中濃度換算値は 0.0042~8.3542 mg/m^3 である。添加直後、直ちに室内空気を 1L/min で 10 分間吸引し、SG1WA をキャップで密栓し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間保存した。24 時間保存の後、溶媒脱着、ADAM 誘導体化をおこない測定した。なお、脱着率試験による気中濃度換算値は 0.10~200.5 mg/m^3 範囲である。表 9 に脱着率の結果を示す。脱着率は 91.5~97.0%であった。

表 9 脱着率結果

通気流量 (L/min)	時間 (h)	通気量 (L)	液量 (mL)	添加量 (μg)	サンプル数	回収率平均 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)	気中濃度換算値(mg/m^3)	
									10min通気	4h通気
1.0	10	10	5	1.00	(n=5)	93.7	4.7	5.1	0.100	0.0042
				50.0		91.5	4.2	4.6	5.000	0.2083
				2005		97.0	2.7	2.8	200.5	8.3542

室温20.4~22.3 $^{\circ}\text{C}$

湿度21.5~22.5%

添加量2005 μg の脱着溶液はメタノールで40倍希釈しHPLC-FLにて測定

5-6. 添加回収率試験

アジピン酸標準溶液を SG1WA のインレット側フィルタ部に 1、50、2005 μg 添加し、室内空気を 1L/min で 4 時間吸引した。その後、溶媒脱着、ADAM 誘導体化、測定をおこない回収率を求めた。なお、添加回収試験による気中濃度換算値は 0.0042~8.3542 mg/m^3 範囲である。

表 10 に添加回収率結果を示す。回収率は 96.6~99.2%であり、変動係数は 0.9~2.4%であった。

表 10 添加回収率結果

通気流量 (L/min)	時間 (h)	通気量 (L)	液量 (mL)	添加量 (μg)	サンプル数	回収率平均 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)	気中濃度換算値 (mg/m^3)
1.0	4	240	5	1.00	(n=5)	96.6	1.7	1.7	0.0042
				50.0		97.0	2.3	2.4	0.2083
				2005		99.2	0.9	0.9	8.3542

室温20.4~22.3 $^{\circ}\text{C}$

湿度21.5~22.5%

添加量2005 μg の脱着溶液はメタノールで40倍希釈しHPLC-FLにて測定

5-7. 保存性試験

アジピン酸標準溶液を SG1WA のインレット側フィルタ部に 1、50、2005 μg 添加し、室内空気を 1L/min で 10 分間吸引した。その後、SG1WA をキャップで密栓し 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。サンプル作製直後を基準の 0 日目とし、1、3、7 日後に溶媒脱着、ADAM 誘導体化をおこない測定した。保存率は 0 日目の定量値を 100% として保存後の定量値と比較した。表 11、図 7 に保存性の結果を示す。いずれの濃度でも保存率は 90% 以上となり、7 日目までは保存可能であることを確認した。

表 11 保存性結果

添加量 1.00 μg										
通気流量 (L/min)	時間 (min)	通気量 (L)	液量 (mL)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	保存率 (%)	回収率平均 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
1.0	10	10	5	0	(n=3)	1.01	100.0	101.1	1.1	1.1
				1	(n=5)	0.94	92.7	93.7	4.7	5.1
				3	(n=3)	0.91	90.1	91.1	3.2	3.5
				7	(n=3)	0.93	91.9	92.9	3.9	4.2
添加量 50.0 μg										
通気流量 (L/min)	時間 (min)	通気量 (L)	液量 (mL)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	保存率 (%)	回収率平均 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
1.0	10	10	5	0	(n=3)	45.6	100.0	91.1	3.2	3.5
				1	(n=5)	45.7	100.3	91.5	4.2	4.6
				3	(n=3)	46.6	102.2	93.1	4.4	4.7
				7	(n=3)	45.0	98.8	90.0	4.2	4.7
添加量 2005 μg										
通気流量 (L/min)	時間 (min)	通気量 (L)	液量 (mL)	保存日数 (日)	サンプル数	定量値 (μg)	保存率 (%)	回収率平均 (%)	標準偏差 (σ)	変動係数 (C.V.%)
1.0	10	10	5	0	(n=3)	1974	100.0	98.5	1.0	1.1
				1	(n=5)	1944	98.5	97.0	2.7	2.8
				3	(n=3)	1991	100.9	99.3	0.4	0.4
				7	(n=3)	2034	103.1	101.5	0.2	0.2

室温20.4~22.3°C

湿度21.5~22.5%

添加量2005 μg の脱着溶液はメタノールで40倍希釈しHPLC-FLにて測定

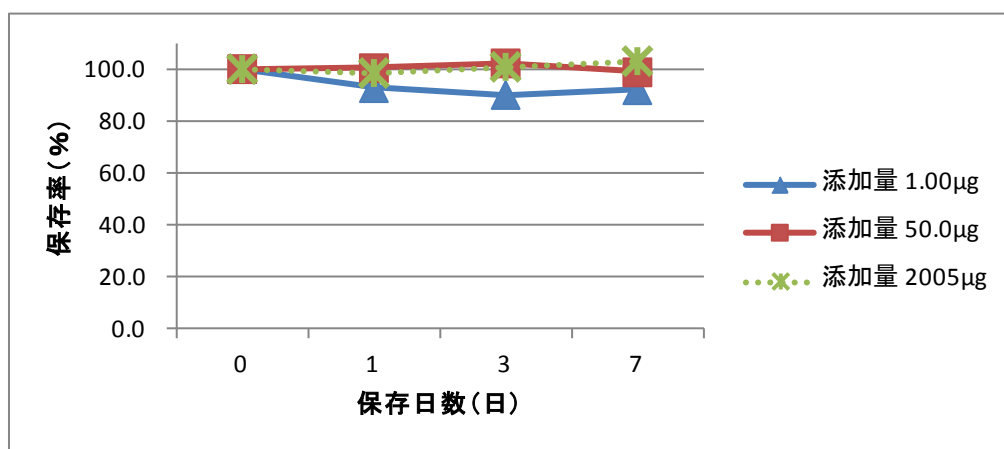


図 7 アジピン酸の保存率

6. まとめ

本検討の結果、アジピン酸を TLV-TWA (5mg/m³) の 1/1000~2 倍相当の範囲までを良好に測定・分析できることを確認した。

なお、捕集剤(NOBIAS RP-SG1WA 大気捕集用)中の高密度ポリエチレンフリッツフィルターによる粉じんの捕集効率についてはその有効性が保障されていないため、対象作業によってはエアロゾルの捕集効率について更なる検討が必要になるであろう。

7. 検討機関

株式会社 日立ハイテクノロジーズ グローバルアプリケーションセンタ

引用文献

- 1) 国際化学物質安全性カード (ICSC) 日本語/英語版、ICSC 番号 0369 (1998 年 3 月更新)
- 2) ACGIH 2007
- 3) N. Nimura and T. Kinoshita, *Analytical Letters*, 13, 191-202 (1980)
- 4) フナコシ(株)HP, 脂肪酸分析用蛍光試薬 ADAM (9-Anthryldiazomethane) 情報
<http://www.funakoshi.co.jp/contents/2376>

(別紙)

アジピン酸標準測定分析法

化学式： C₆H₁₀O₄
CAS No.： 124-04-9

許容濃度等：
ACGIH TLV-TWA： 5mg/m³
OSHA TLV-TWA： —
日本産業衛生学会： —

物性等
分子量： 146.14 沸点(°C)： 338°C
融点： 152°C 蒸気圧： 10Pa
形状： 結晶性粉末 密度： 1.36g/mL
655C

別名 ヘキサン二酸 ， 1,4-ブタンジカルボン酸

サンプリング

分析

サンプラー：NOBIAS RP-SG1WA (大気捕集用)
(株)日立ハイテクノロジーズ製)
サンプリング流量： 1.0L/min
サンプリング時間： 10分 (10L)
4時間 (240L)
採気量： 10L以上
保存性： 添加量 1.00 μg、50.0 μg、2005 μg
において、冷蔵で少なくとも7日
間は安定である事を確認。
ブランク： 分析時はブランクが必要。

分析方法： 高速液体クロマトグラフ法
脱着方法： メタノール(HPLC用)5mLを1mL/min流速にて
通液脱着する。
プレカラム誘導体化
1) ADAM(9-アンスロニルジアゾメタン、フナコシ(株)製)を
酢酸エチル(HPLC用)で溶解し0.1%(w/v)に調製。この
ADAM反応溶液は用時調製とする。
2) 試料溶液0.5mLをHPLC測定用の褐色バイアル瓶(2mL)
に移し入れ、ADAM反応溶液0.5mLを添加する。ボルテ
ックスミキサで30秒攪拌し、室温(25°C)で4時間以上
静置する。

精度

標準溶液： アジピン酸をメタノールで溶解し、メタノ
ールで適宜希釈して調製する。その後、プレカラム誘導
体化を行い測定に用いる。

脱着率：
添加量 1.00 μg の場合 93.7%
50.0 μg の場合 91.5%
2005 μg の場合 97.0%

測定条件
機器： 日立高速液体クロマトグラフ Chromaster
(株)日立ハイテクノロジーズ製)
カラム： LaChrom C18(4.6mmI.D., ×150mmL, 5 μm)
(株)日立ハイテクノロジーズ製)
カラム温度： 40°C
移動相： (A)アセトニトリル(HPLC用), (B)H₂O,
(C)アセトニトリル/酢酸エチル=90/10
グラジエントタイムプログラム：

回収率： (4時間通気)
添加量 1.00 μg の場合 96.6%
50.0 μg の場合 97.0%
2005 μg の場合 99.2%

時間(min)	%A	%B	%C
0.0	81.0	19.0	0.0
15.0	81.0	19.0	0.0
15.1	0.0	0.0	100.0
25.0	0.0	0.0	100.0
25.1	81.0	19.0	0.0
45.0	81.0	19.0	0.0

検出下限 (3σ) 0.0045 μg/mL(最終試料液
濃度)
定量下限 (10σ) 0.0152 μg/mL(最終試料液
濃度)
採気量 100 0.0076mg/m³
採気量 2400 0.0003mg/m³

流速： 1.0mL/min
検出器： 蛍光検出器 (Ex=365nm, Em=412nm)
試料注入量： 20 μL
検量線： 0.05~10 μg/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：

注；エアロゾルの捕集効率については更なる検討が必要