

- reproductive and developmental toxicity, the differences with age and species in testicular toxicity, and tolerable daily intake of DEHP. *Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi* (Jpn. J. Food Chem.), 8, 1-10 (2001)
- 7) Wilkinson, F. C., Lamb, IV, C. J., The potential health effects of phthalate esters in children's toys: A review and risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30, 140-155 (1999)
- 8) 杉田たき子、河村葉子、谷村雅子、松田りえ子、新野竜大、石橋亨、平林尚之、松木容彦、山田隆、米谷民雄：乳幼児用軟質ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステル暴露量の推定、*食品衛生学雑誌*、44、96-102 (2003)
- 9) CONSUMER PRODUCT SAFETY IMPROVEMENT ACT OF 2008, PUBLIC LAW 110-314 (2008)
- 10) DIRECTIVE 2005/84/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 14 December 2005 amending for the 22nd time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles), *Official Journal of the European Union*, L344/40 (2005)
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 ‘食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について’ 平成 22 年 9 月 6 日 食安発 0906 第 1 号
- 12) CPSC, Prohibition of Children's Toys and Child Care Articles Containing Specified Phthalates, 16 CFR Part 1307 (2014)
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 ‘おもちゃにおけるフタル酸エステルの試験法について’ 平成 22 年 9 月 6 日 食安発 0906 第 4 号
- 14) EN 14372:2004, Child use and care articles - Cutlery and feeding utensils - Safety requirements and tests (2004)
- 15) METHOD 3546, MICROWAVE EXTRACTION, SW-846, EPA (2007)
- 16) CPSIA, Test Method: CPSC-CH-C1001-09.3, Standard Operating Procedure for Determination of Phthalates (2010)
- 17) 阿部 裕、平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 DART-OT/MS および qNMR を用いた迅速かつ簡便な可塑剤分析法の検討 総括研究報告書 (2015)
- 18) 阿部 裕、山口未来、六鹿元雄、平原嘉親、河村麻衣子、花尻 (木倉) 瑠理、合田幸広、河村葉子：DART-TOF/MS を用いたポリ塩化ビニル中の可塑剤の検索及びフタル酸エステルのスクリーニング法の検討、*食品衛生学雑誌*、51、160-169 (2010)
- 19) R. Paseiro-Cerrato, G. O. Noonan, T. H. Begley, Development of a rapid screening method to determine primary aromatic amines in kitchen utensils using direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS), *Food Additives & Contaminants: A*, 31, 537-545 (2014)

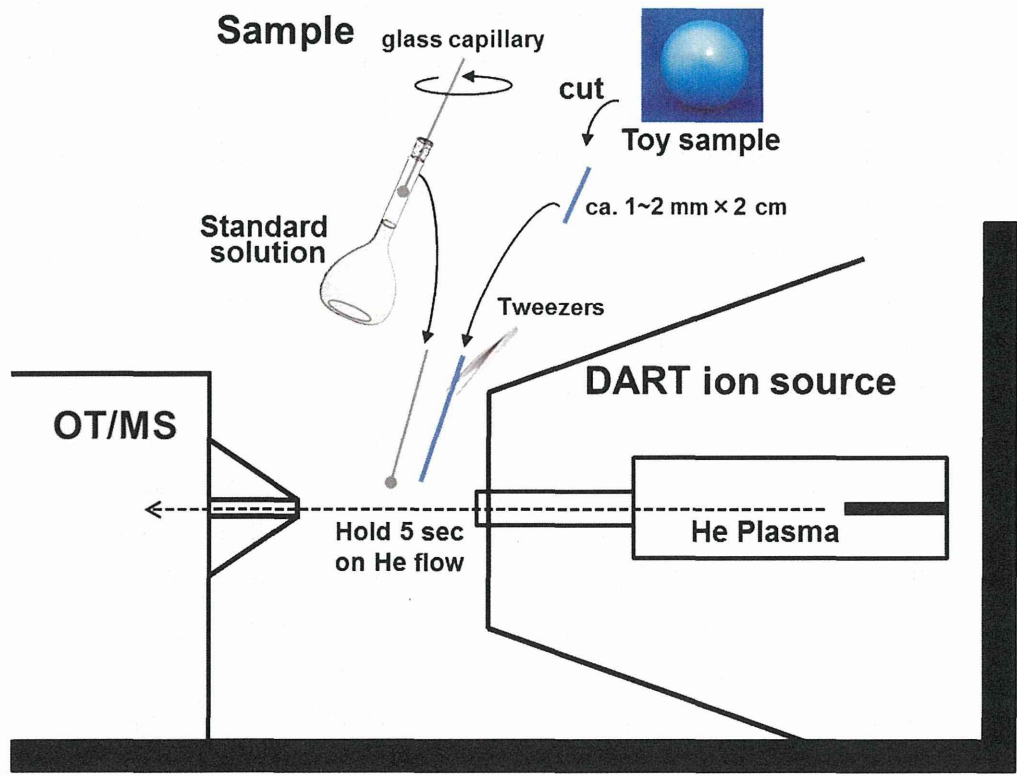


図1 DART-OT/MS 分析の模式図

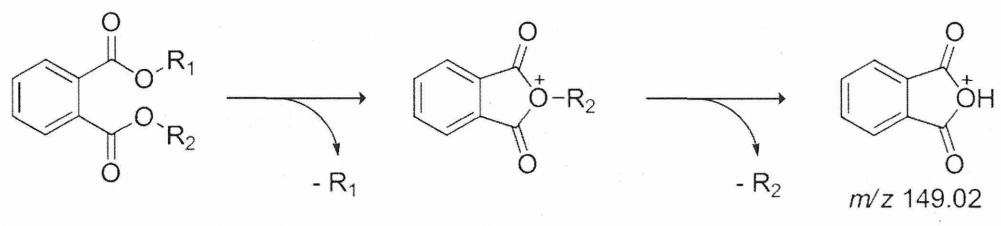


図3 PAE のフラグメンテーション(推定)

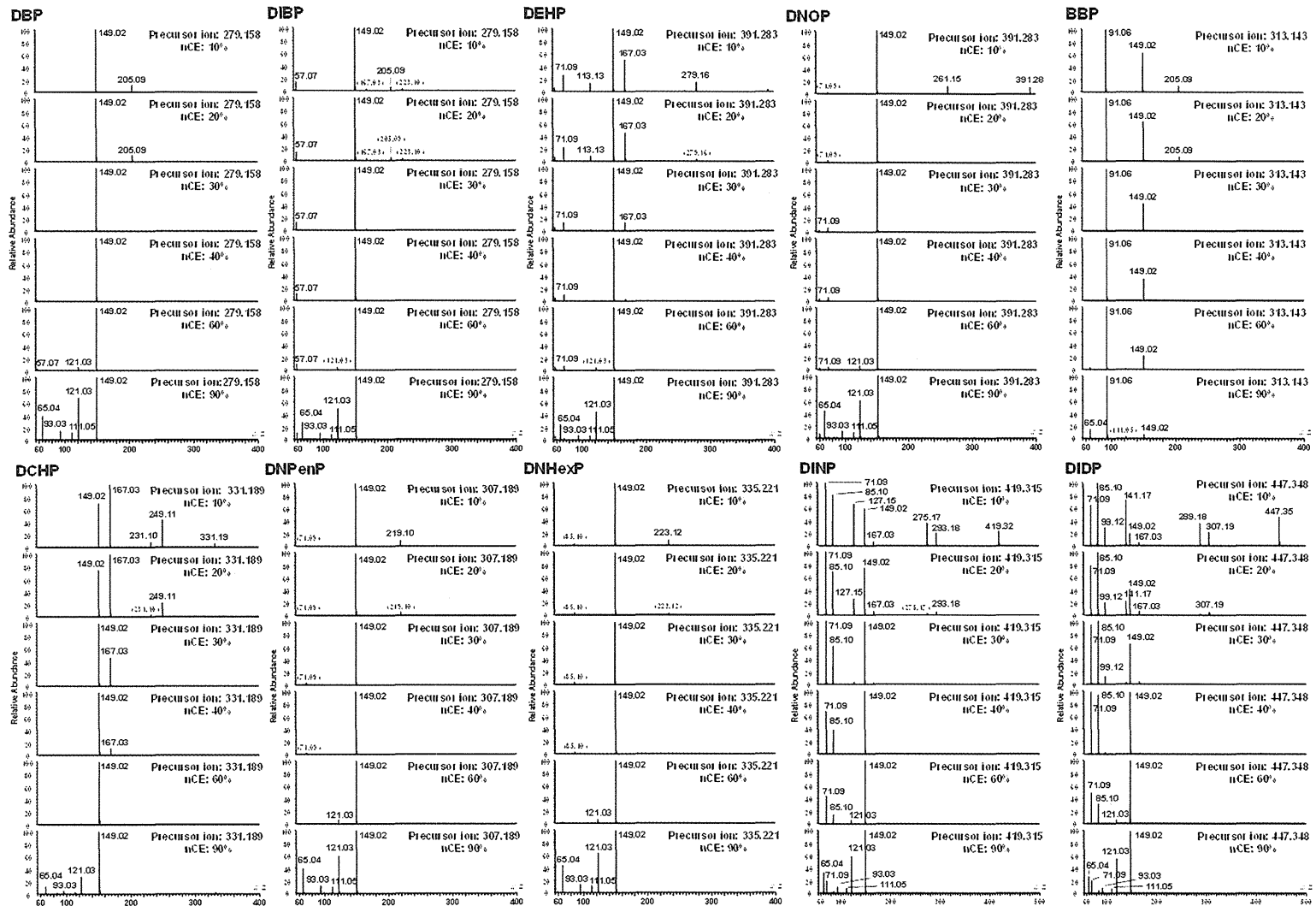


図2 各 nCE 条件における 10 種の PAEs の MS/MS スペクトル

() はイオン強度比は 5% 未満だったが特徴的なプロダクトイオンを示した

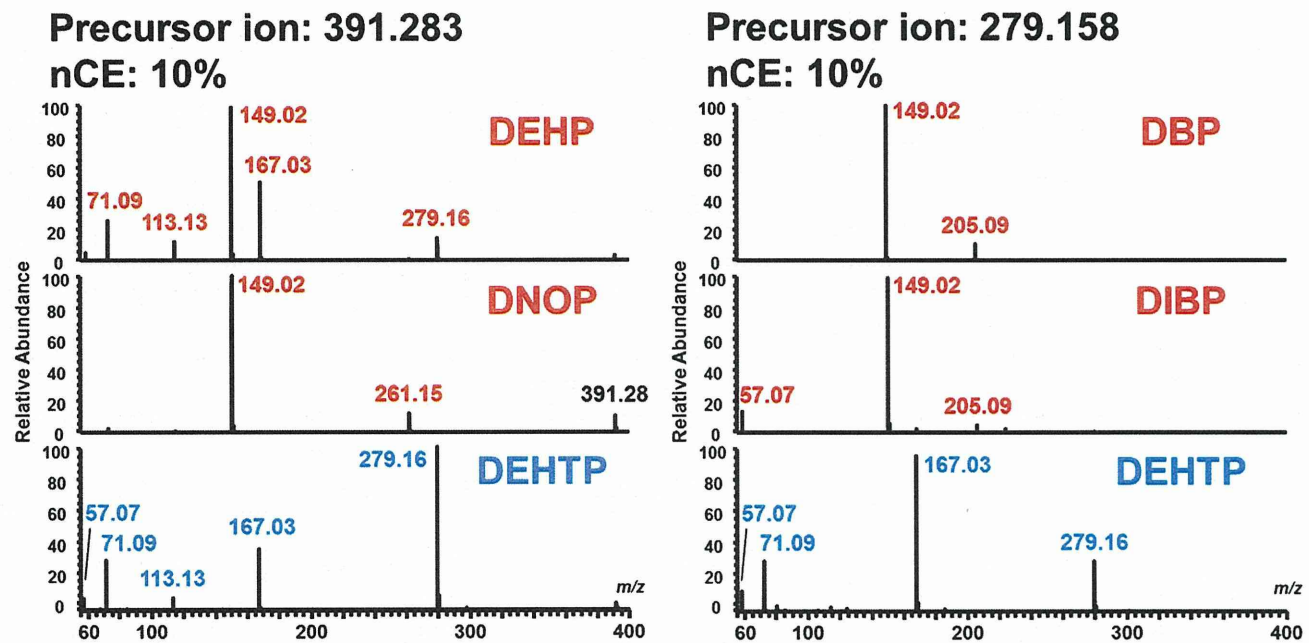
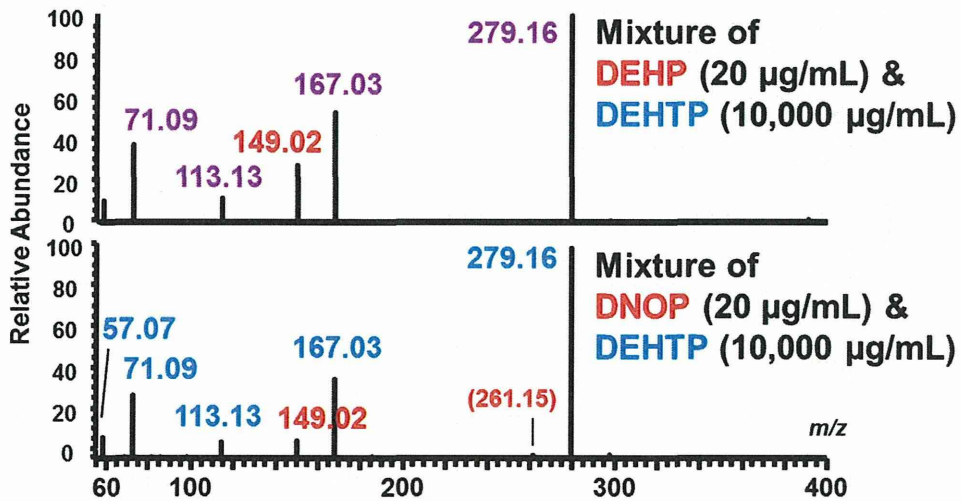


図4 DEHTPのMS/MS スペクトル

左) プリカーサーイオン: m/z 391.283, nCE: 10%; 右) プリカーサーイオン: m/z 279.158, nCE: 10%

Precursor ion: 391.283

nCE: 10%



Precursor ion: 279.158

nCE: 10%

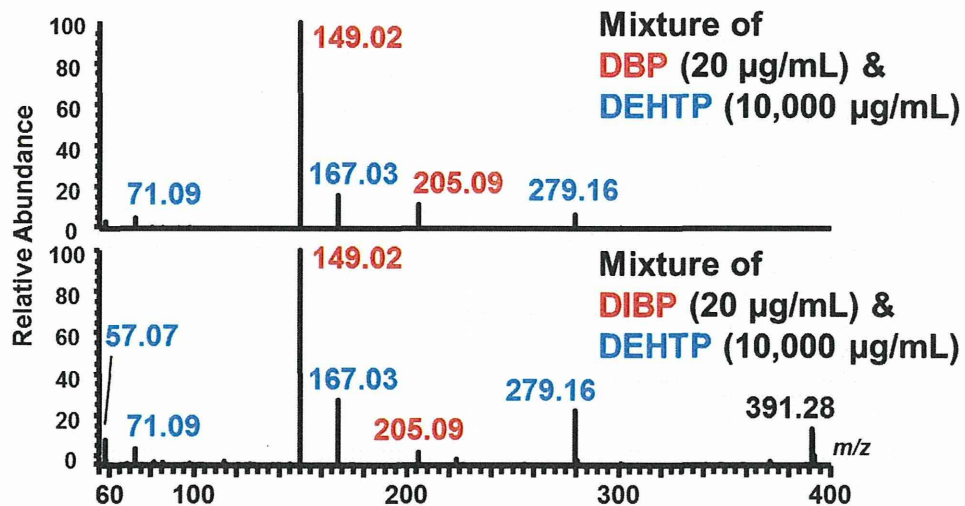
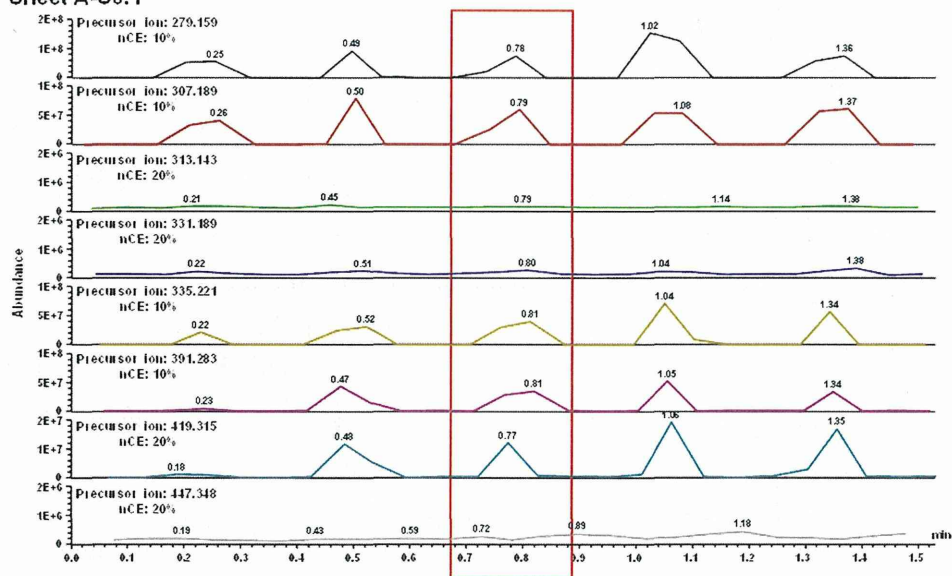


図5 DEHTP と PAEs の混合標準溶液の MS/MS スペクトル
上) DEHTP と DEHP/DNOP、右) DEHTP と DBP/DIBP
赤字は DBP もしくは DIBP 由来、青字は DEHTP 由来、紫字は共通

Sheet A-S0.1



Sheet B-S0.1

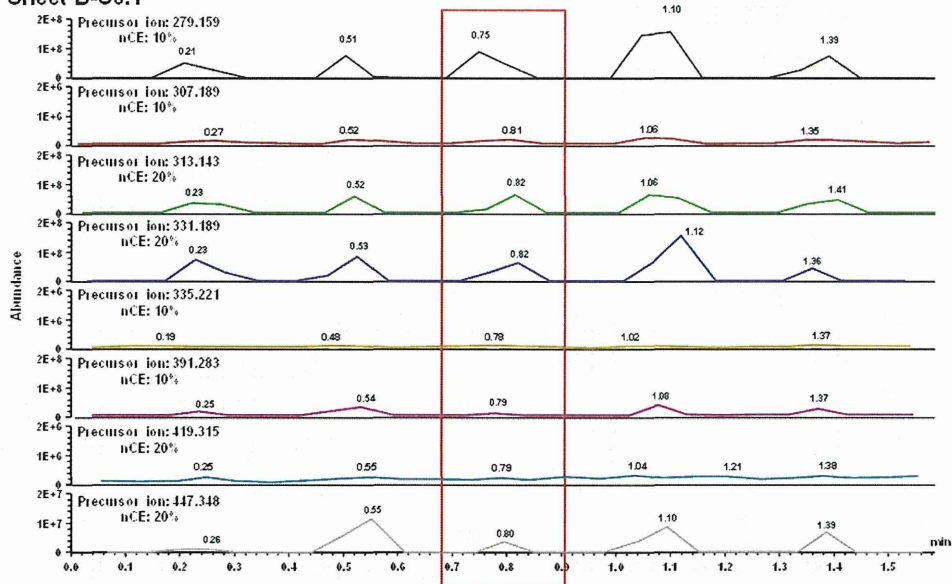
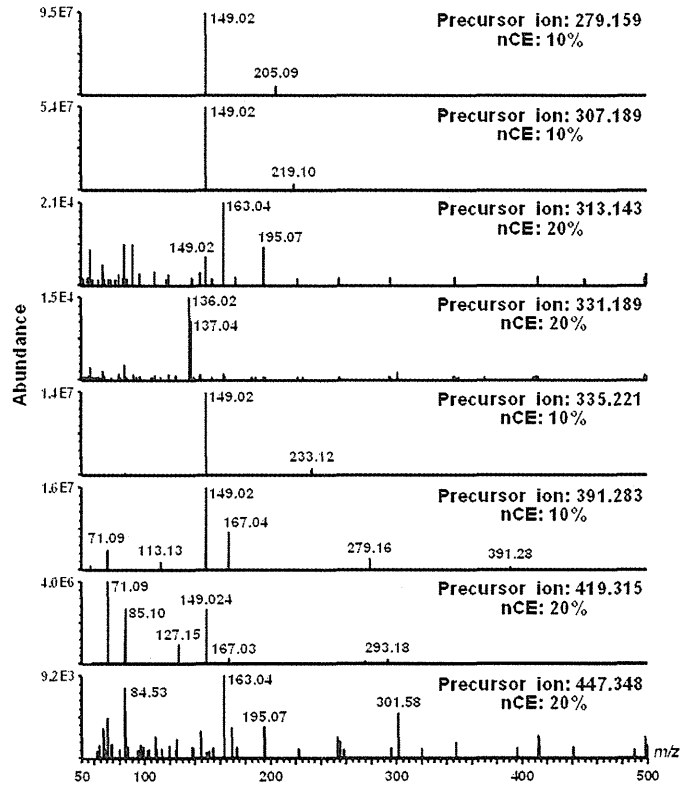


図6 PVC 製シートから得られた TIC
上段: Sheet A-S01; 下段: Sheet B-S01

Sheet A-S0.1



Sheet B-S0.1

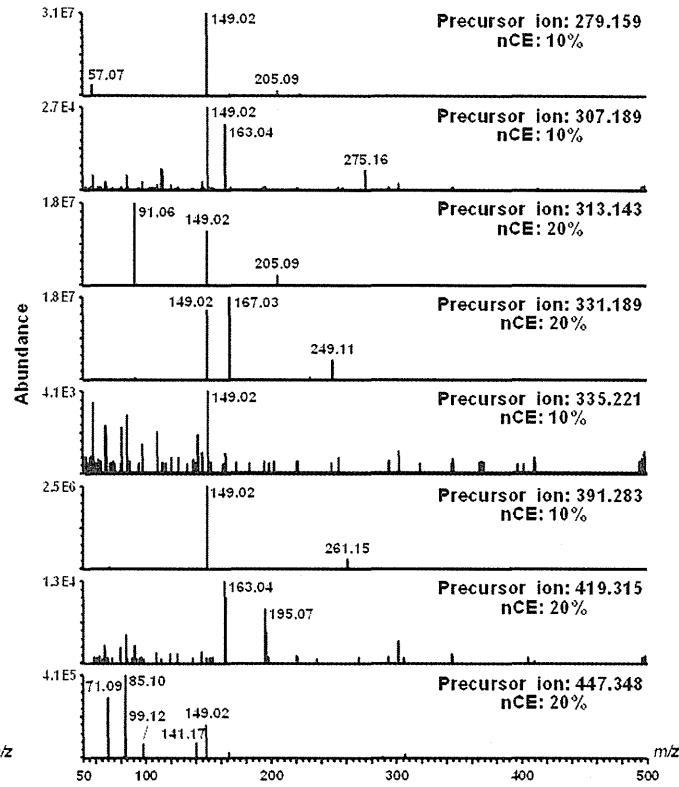


図7 PVC 製シートの MS/MS スペクトル

左) Sheet A-S01; 右) Sheet B-S01
それぞれ図6の 0.75 分付近のピークから抽出した

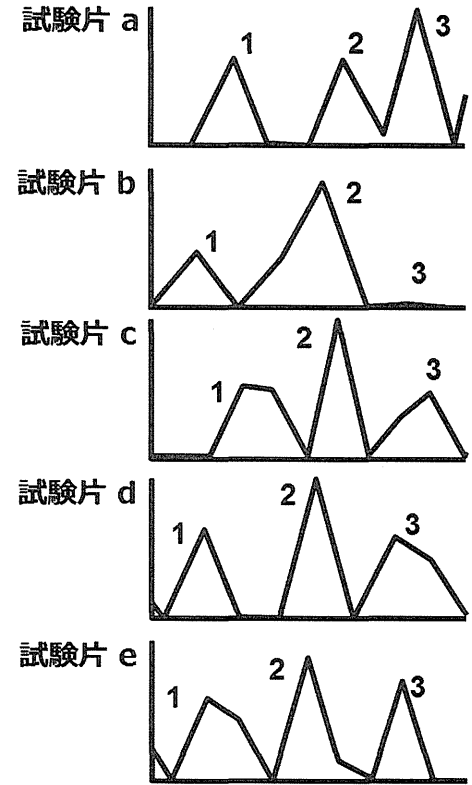


図8 Sheet A-S01 の TIC
(m/z 279.158, CE:10%)

＜その2＞ NMR を用いたポリ塩化ビニル製品中の フタル酸エステル類の正確な定量法の開発

A. 研究目的

核磁気共鳴 (NMR) は、有機化合物の化学構造の決定などに用いる定性分析法として広く利用されてきたが、近年の NMR 装置の高度化、プローブの改良、シグナル処理技術の向上などにより、定量分析を目的とした定量 NMR (qNMR) として用いられるようになった。特に ^1H -NMR を用いた定量法は、NMR スペクトル上に観察される測定対象物質および内標準物質のシグナル積分値の比が「モル濃度×水素数」に比例することを利用し、測定対象物質および内標準物質のシグナル積分値の比、水素数、秤量濃度の関係から、測定対象物質の含量を正確に求めることが可能である。また、内標準物質として、国際単位系 (SI) にトレーサブルな認証標準物質 (Certified Reference Material : CRM) を用いることで、得られる定量値の SI トレーサビリティが確保され、その定量値の信頼性がより高まり、これまでに、食品添加物、生薬、天然化合物などへの応用例が報告¹⁻⁴⁾されるなど、正確な定量法として幅広く利用されはじめている。

我々は本研究において DART-OT/MS を用いたポリ塩化ビニル (PVC) 中のフタル酸エステル類 (PAEs) の迅速スクリーニング法を報告した。本法では前処理せずに PVC 製品中に含有される規制対象の PAEs を迅速、簡便かつ正確に検出可能であった。しかし、DART を用いた測定は定量性を有していないため⁵⁾、本スクリーニングにより PAEs の含有が疑わ

れた場合は、規格値 (0.1%) を超えているか判定するための定量分析が必要となる。

PAEs の定量分析は、試験溶液を調製後、ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器 (GC-FID) もしくは GC-質量分析計 (MS) を用いて測定し、標準溶液を用いてあらかじめ作成した検量線を用いて定量する。このうち、試験溶液の調製法には抽出法⁶⁾と溶解法⁷⁾があるが、いずれも試験溶液中に塩化ビニルオリゴマーが含まれるため、特に GC/MS を用いた場合、マトリックス効果により真値よりも高い定量値が得られたり、定量値がばらつくといった問題点がある⁸⁾。そのため、試験溶液をアセトン等で希釈して測定する必要があるが、DINP および DIDP は他に比べ感度が低いため、希釈により定量下限を下回り定量できない可能性がある。また、製品には PAEs 以外の可塑剤が大量に共存しており、その影響により正確な定量が困難な場合がある。特に、DNOP はアジピン酸ジイソニル (DINA) もしくはシクロヘキサジカルボン酸ジイソノニル (DINCH)、DINP は DINCH と共存している場合、試験溶液を 50 倍希釈しても真度は 130% を超え、正確な適否判定が困難であった⁹⁾。

本研究では、NMR を用いて PVC 中の PAEs を正確に定量可能か検討するとともに、＜その1 DART-OT/MS を用いた 10 種の PAEs の迅速スクリーニング法の開発＞により開発したスクリーニング法と組み合わせた新しい PVC 製品中の PAEs の分析法を提案した。

B. 研究方法

1. 試薬等

1) 試薬

①標準品

本研究で使用した可塑剤標準品の化学名、略号、CAS 番号、分子式および純度を表 1 に示した。なお、PAEs は全てフタル酸エステル試験用を用いた。

②標準物質および認証標準物質

1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄ (BTMSB-*d*₄)

標準物質: Lot. KPQ4815、純度 99.9% 和光純薬工業 (株) 製

マレイン酸 (MA) 標準物質: Lot. BCBG200V、

純度 99.99%、シグマ-アルドリッチ社製

高純度フタル酸ジエチル (DEP) 認証標準

物質: Lot. 125、純度 99.98%、(独) 産業技術総合研究所製

上記標準物質および認証標準物質は、(独) 産業技術総合研究所により国際単位系 (SI) にトレーサブルな分析法により特性値 (純度) が付与されたものである。

③重溶媒

重アセトン-*d*₆ および重メタノール-*d*₄: 関東化学社製

④その他

アセトン: 残留農薬・PCB 分析用アセトン 300 SIGMA-ALDRICH 社製

ヘキサン: 残留農薬・PCB 試験用ヘキサン 300 和光純薬工業社製

表 1 本研究で用いた6種のPAEsおよびその他の可塑剤

No.	化学名	略号もしくは製品名	CAS番号	分子式	純度 (%)
6種のPAEs					
1	Di- <i>n</i> -butyl phthalate	DBP	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	>99***
2	Benzyl butyl phthalate	BBP	85-68-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	>99***
3	Di(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	>99***
4	Di- <i>n</i> -octyl phthalate	DNOP	117-84-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	>98***
5	Diisononyl phthalate	DINP	28553-12-0	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	>98***
6	Diisodecyl phthalate	DIDP	26761-40-0	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	>98***
その他の可塑剤					
7	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	TMPD	6846-50-0	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	>97
8	Diisobutyl phthalate	DIBP	84-69-5	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	>98
9	Dibutyl sebacate	DBS	109-43-3	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	>97
10	Tributyl citrate	TBC	77-94-1	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	>98
11	<i>o</i> -Acetyl tributyl citrate	ATBC	77-90-7	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	>90
12	Di(2-ethylhexyl) adipate	DEHA	103-23-1	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	>98
13	Dipropylene glycol dibenzoate*	DPGDB	25265-71-8	C ₆ H ₁₄ O ₃	>95
14	Alkylsulfonic acid phenyl ester*	ASP	-**	-**	-**
15	Diisononyl adipate	DINA	33703-08-1	C ₂₄ H ₄₆ O ₄	-**
16	Diisononyl 1,2-cyclohexane dicarboxylate	DINCH	166412-73-8	C ₂₆ H ₄₈ O ₄	-**
17	Bis(2-ethylhexyl) terephthalate	DEHTP	6422-86-2	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	>98
18	Tris(2-ethylhexyl) trimellitate	TEHTM	3319-31-1	C ₃₃ H ₅₄ O ₆	>95
19	Diphenyl(2-ethylhexyl) phosphate	DPEHF	1241-94-7	C ₂₀ H ₂₇ O ₄ P	-**

*アルキル数が異なる炭素鎖を側鎖に有する類似体の混合物。分子量は主化合物について示した。

不明, *製品に記載の純度

2) 標準溶液

PAE 標準原液:各 PAE 標準品 2 mg をとり、アセトンをホールピペットで加えて 10 mL とした (0.2 mg/mL)。各 PAE 標準原液は適宜調製した。

内標準溶液: MA 5 mg および BTMSB- d_4 1 mg を正確にアルミ製精秤皿にとり、ホールピペットでアセトン- d_6 を 10 mL を加え完全に溶解させた。この液 5 mL をホールピペットで 50 mL 容メスフラスコに採り、アセトン- d_6 を加え 50 mL に定容した (MA:0.05 mg/mL、BTMSB- d_4 : 0.01 mg/mL)。内標準溶液はクイック保存瓶 (関東化学 (株) 製) に入れ室温で保存し、使用するたびに BTMSB および MA 濃度を DEP により計算した。

2. 試料

PVC 製玩具 3 検体。これらの含有可塑剤を表 2 にまとめた。なお、これらの含有量は「<その 3> ポリ塩化ビニル製玩具の使用可塑剤実態調査」により得られた。

3. 装置および器具

マイクロ天秤: XP-2U メトラートレド社製

遠心機: H-80K KOKUSAN 社製

NMR: JNM-ECZ600 日本電子 (株) 製

NMR プローブ: CH UltraCOOL プローブ
日本電子(株)製

4. NMR による測定

1) NMR 測定条件

^{13}C デカップリング: ON (MPF-8)

Spectral width: -5~15 ppm

Data points: 48000

Auto filter: On (21 times)

Flip angle: 90°

Pulse delay: 60 s (>5*T1)

Sample spin: No spin

Probe temperature: 室温.

Acq_Time: 4 (s)

Repetition_Time: 64 (s)

X_Resolution: 0.25 (Hz)

スキャン回数: 適宜

2) NMR データ解析

得られた FID データを以下のウィンドウ関数によりフーリエ変換した。Delta v5.0.5 を用いてベースライオン補正をしたのち、各シグナル積分値求めた。

ウィンドウ関数 (台形: 80%, 指数関数: BF 0.2 (Hz), ゼロフィル: なし)

3) PAEs 標準品の純度測定

各 PAEs 1 mg、MA 1 mg を精秤し、アセトン- d_6 を 1 mL 加え完全に溶解させたものを、NMR で測定 (スキャン回数: 32 回) し、データ処理で得られた各シグナル積分値を以下の式に導入し、各 PAEs の純度を求めた。試料調製から測定までを 3 回繰り返した。

PAEs 標準品純度 (%) =

$$\left(\frac{I_{\text{PAE}}/H_{\text{PAE}}}{I_{\text{MA}}/H_{\text{MA}}} \times \frac{M_{\text{PAE}}/W_{\text{PAE}}}{M_{\text{MA}}/W_{\text{MA}}} \right) \times 100$$

$I_{\text{PAE}}, I_{\text{MA}}$ = PAE および MA の定量用シグナルの積分値
 $H_{\text{PAE}}, H_{\text{MA}}$ = PAE および MA の定量用シグナルの水素数
 $M_{\text{PAE}}, M_{\text{MA}}$ = PAE および MA の平均分子量
 $W_{\text{PAE}}, W_{\text{MA}}$ = PAE および MA の秤量値 (mg)
*BTMSB を用いた場合は MA を全て BTMSB に変更

表 2 PVC 製玩具および含有可塑剤

玩具	含有可塑剤 (含有量%)
人形	DINA (12.3%)、ATBC (6.3%)
ストラップ	DINCH (26.0%)
風呂用玩具	DEHTP (28%)、DINCH (0.94%)、TMPD (0.28%)

4) 測定溶液の調製

①玩具抽出液の調製

細切した試料 2.5 g を精秤して 250 mL 容共栓付き三角フラスコに採り、アセトン・ヘキサン混液 (3:7) 100 mL を加えて振り混ぜた後、密栓をして約 40°C の恒温器内で一晩静置した。冷後ろ紙を用いてろ過し、得られたろ液及びアセトンによる洗液を 250 mL 容メスフラスコにあつめ、さらにアセトンを加えて 250 mL に定容した。

②試料溶液 (10、100、1,000 および 5,000 µg/mL) の調製

(1) 10 µg/mL : 各 PAE 標準原液 2.5 mL をホールピペットでとり、玩具抽出液を加え 50 mL に定容した。

(2) 100 µg/mL : DEHP 標準品 1 mg を量り、玩具抽出液を加えて 5 mL とした。

(3) 1,000 µg/mL : DEHP 標準品 5 mg を量り、玩具抽出液を加えて 5 mL とした。

(4) 5,000 µg/mL : DEHP 標準品 25 mg を量り、玩具抽出液を加えて 5 mL とした。

③測定溶液の調製

(1) 測定溶液 (100、1,000 および 5,000 µg/mL) : 試料溶液 1 mL をホールピペットで 10 mL 容共栓付きガラス試験管に採り、窒素気流下で溶媒を除去したのち、残渣に内標準溶液 1 mL をホールピペットで加え溶解させた。

(2) 測定溶液 (10 µg/mL) : 試料溶液 10 mL を 50 mL 容ねじ口ガラス試験管に採り、窒素気流下で穏やかに溶媒を除去した。ヘキサン 2 mL を加え、810 ×g で 3 分間遠心したのち、上清を採り、あらかじめアセトン 10 mL およびヘキサン 10 mL の順で平衡化した Sep-pak Plus Alumina N カートリッジにロードした。ヘキサン 10 mL で洗浄したのち、5%もしくは 10%のアセトンを含むヘキサン 10 mL で溶出し、窒素気流下で溶媒を除去し、残渣に内標準溶液 1 mL をホールピペットで加え溶解さ

せた。

④回収率の算出

NMR 測定により得られた各シグナル積分値を以下の式に導入し、回収率を求めた。試料調製から測定までを 3 回繰り返した。

回収率 (%) =

$$\left[\frac{I_{\text{PAE}}/H_{\text{PAE}}}{I_{\text{MA}}/H_{\text{MA}}} \times \frac{M_{\text{PAE}}/W_{\text{PAE}}}{M_{\text{MA}}/W_{\text{MA}}} \right] \times 100$$

$I_{\text{PAE}}, I_{\text{MA}}$ = PAE および MA の定量用シグナルの積分値
 $H_{\text{PAE}}, H_{\text{MA}}$ = PAE および MA の定量用シグナルの水素数
 $M_{\text{PAE}}, M_{\text{MA}}$ = PAE および MA の平均分子量
 W_{PAE} = 試料溶液中の PAE 濃度 (mg/mL)
 W_{MA} = MA の秤量値 (mg)
*BTMSB を用いた場合は MA を全て BTMSB に変更

C. 研究結果と考察

1. NMR 適用性の検討

NMR を用いた精確な定量には、各化合物に由来する NMR シグナルの帰属、分子内の各シグナルの分離後および積分値などの情報が不可欠である。そこで、6 種の PAEs 標準品および代表的な可塑剤標準品の ¹H-NMR を測定し、NMR スペクトルパターンを収集した。測定溶媒にはアセトン-*d*₆ を用いた。なお、代表的な可塑剤として、本研究報告書の「＜その 3＞ポリ塩化ビニル製玩具の使用可塑剤実態調査」で検出された DEHTP、DINCH、ATBC など、およびこれまでの使用実態調査で検出報告がある TEHTM など 13 種類 (表 1) を対象とした。

1) PAEs およびその他可塑剤の NMR スペクトル

6 種の PAEs の NMR スペクトルを各シグナルの帰属結果とともに図 1-1~4 に示した。いずれもフタル酸部分は共通しており、 δ 7.66 (Ph1 : 水素数 2) および 7.76 ppm (Ph2 : 水素数 2 もしくは Ph3 : 1) のシグナル、BBP では δ 7.79 ppm (Ph3 : 水素数 1) のシグナルも確認された。その他はそれぞれ側鎖に結合する脂肪族炭化水素もしくは芳香族炭化水素

に由来するシグナルであった。

その他の可塑剤の NMR スペクトルを図 2 に示した。構造内に芳香族環を持たないアジピン酸エステル類の DEHA および DINA、クエン酸エステル類の ATBC および TBC、ならびに DINCH、TMPD などでは、 $\delta 5.0$ ppm 以上の低磁場側にはシグナルが一切観察されなかったが、 $\delta 5.0$ ppm 以下の高磁場側には側鎖の脂肪族炭化水素に由来する多数のシグナルが確認された。一方、芳香族環を有している DIBP、DPGDB、ASP、DETHP、TEHTM および DPEHF では低磁場側 ($\delta 5.0$ ppm 以上) に複数もしくは 1 本のシグナルが観測され、高磁場側 ($\delta 5.0$ ppm 以下) にも側鎖由来の多数のシグナルが観測された。

2) PAEs とその他可塑剤のシグナルの重複

NMR を用いた PAEs の定量においては、PAEs の定量用シグナルは混合物や不純物に由来するシグナルと十分分離している必要があるため、PAEs に由来するシグナルとその他の可塑剤に由来するシグナルの重複を確認した。

高磁場側には、PAEs を含む全ての可塑剤において脂肪族炭化水素に由来する多数のシグナルが観測された。一部 PAEs とは重複しないシグナルもあったが、ほとんどが重複したため、高磁場側のシグナルは定量には不適であると考えられた。

一方、低磁場側のシグナルは芳香族環に由来するもので、6 種の PAEs および DIBP のシグナルは BBP の Ph3 を除いて全て一致した。

また、その他に芳香族環を有する可塑剤は 5 種類あった。PAEs の Ph1~3 のシグナルとこれらの芳香族環に由来するシグナルが重複するかを確認するため、BBP、DPGDB、ASP、DETHP、TEHTM および DPEHF の NMR スペクトルのうち $\delta 6.5\sim 8.5$ ppm の範囲の拡大図を図 3-1 に示した。PVC 製玩具において使用頻度が非常に高い DEHTP のシグナルは $\delta 8.15$

ppm に観測され、PAEs のシグナルとは大きく離れており定量に影響はないと考えられた。同様に、ASP、TEHTM および DEHTF のシグナルも完全に離れており、定量に影響はないと考えられた。一方、DPGDB の $\delta 7.6$ ppm 付近のシグナルが PAEs の Ph1 ($\delta 7.66$ ppm) と完全に重複し、また、Ph2 ($\delta 7.76$ ppm) のシグナルもわずかに重複していた。そこで、測定溶媒をメタノール- d_4 を用いて比較した結果 (図 3-2)、DPGDB の $\delta 7.6$ ppm 付近のシグナルは PAEs の Ph1 ($\delta 7.66$ ppm) と完全に重複したが、Ph2 ($\delta 7.76$ ppm) とは重複しなかった。したがって、測定溶媒にアセトン- d_6 もしくはメタノール- d_4 を用いることで、PAEs の芳香族環に由来するシグナルは他の可塑剤由来のシグナルと重複しないことが確認された。

3) 定量用シグナルの選択

これまで述べたように、定量用シグナルにはフタル酸に由来する $\delta 7.66$ および 7.76 ppm が適していると考えられた。しかし、これらのシグナルは PAEs に共通しているため、1 検体に複数の PAEs が含有されている場合は適用できない。しかし、本研究の「<その 3>ポリ塩化ビニル製玩具の使用可塑剤実態調査」において、PAEs が検出されたのは 508 検体中 51 検体であり、そのうち 1 検体あたり 2 種類以上の PAEs が含有されていたのはわずかに 2 検体だけであった。したがって、大部分の試料では PAEs は 1 種類のみが含有されているため、本法を適用可能であると考えられた。

$\delta 7.66$ ppm のシグナルはフタル酸の Ph1、 $\delta 7.76$ ppm は Ph2 に由来するが、これらの分離度は十分とは言えない (図 4-1)。そこで、BBP 以外の PAEs の定量計算にはこれら二つのシグナルの合計積分値および合計水素数 (4) を原則として用いることとした。ただし、各シグナルの積分値を確認し、二つの積分値

が異なっていた場合は、積分値が大きいシグナルに他の化合物由来のシグナルが重複していると推測される。そのため、このような場合の定量計算には他の化合物が重複していないシグナルのみを使用し、積分値は図4-2に示す範囲とした。

一方、BBPについては、Ph1~3の三つのシグナルの合計積分値および合計水素数(4)を原則として用いることとし、各シグナルに他の化合物の重複が確認された場合は、他の化合物が重複していないシグナルのみを使用した。

2. 内標準物質の検討

NMRを用いた定量にはSIにトレーサブルな認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)が用いられる。内標準物質は、1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- d_4 (BTMSB- d_4)、2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸- d_6 ナトリウム塩(sodium-3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- d_6 -sulfonate, DSS- d_6)、マレイン酸(Maleic acid: MA)、フタル酸ジエチル(diethyl phthalate: DEP)などが用いられる。このうち、BTMSB- d_4 およびDSS- d_6 は $\delta 0$ ppmに1本のシグナルが観測されるため、全ての化合物の定量に用いることができる。一方、MAは $\delta 6.4$ ppmに1本のシグナル、DEPは $\delta 7.66$ および 7.76 ppmに各1本のシグナルが検出されるため、芳香族環に由来するシグナルの定量に適している。本研究ではPAEsの芳香族環を定量用シグナルとしているため、MAが適していると考えられた。また、MAの場合、図2に示したように、いずれの可塑剤においてもMAの定量用シグナルである $\delta 6.4$ ppm付近にはシグナルは観察されなかった。したがって、本研究では内標準物質としてMAを用いることとした。ただし、実際の試料中には $\delta 6.4$ ppmのシグナルと重複するシグナルを有する化合物が含ま

れている可能性があるため、BTMSB- d_4 とMAの積分比を常に確認し、他の化合物の重複が疑われた場合はBTMSB- d_4 を用いて定量することとした。

3. 試験溶液調製法の検討

1) PAEs標準品の純度測定

以降の検討にはPAEs標準品の正確な含量が不可欠であるため、測定溶媒としてアセトン- d_6 、内標準物質としてMAを用いて、qNMRによるPAEs標準品の純度測定を行った。その結果を表3に示した。純度は99.8~100.6%であり、この純度を以降の計算に用いた。

表3 各PAEsの純度

PAEs	純度
DBP	100.6 ± 0.2
BBP	100.3 ± 0.3
DEHP	99.8 ± 0.5
DNOP	99.9 ± 0.3
DINP	99.8 ± 0.0
DIDP	100.2 ± 0.1

回収率 ± 標準偏差 (n=3)

2) 試料溶液の調製

試験溶液の調製法の検討において、正確なPAEs含有量が判明している試料を入手することは困難であった。そこで、PAEsを含有しない試料から得られた抽出液に既知量のPAEsを添加したものを試料溶液とし、試験溶液の代わりに用いた。

以前の研究において、GC/MSによる測定ではDINAもしくはDINCHが共存しているとDNOPおよびDINPの正確な定量値が得られなかった⁹⁾。また、本研究の「〈その3〉ポリ塩化ビニル製玩具の使用可塑剤実態調査」において最も検出率が高かったのはDEHTPであった。そこで、抽出液調製用の試料はこれらを含む人形(DINA: 12.3%、ATBC:

6.3%)、ストラップ (DINCH: 26.0%) および風呂用玩具 (DEHP: 28%、DINCH: 0.94%、TMPD: 0.28%) の3検体を用いた (表2)。

また、PAEsとしてDEHPを用い、試料溶液中のDEHP濃度は10、100、1,000および5,000 $\mu\text{g/mL}$ とした。この濃度は試料中のDEHP濃度に換算すると、0.1、1、10および50%に相当する。

3) 転溶法による回収率

試料溶液はアセトン・ヘキサン混液であるためそのままではNMR測定はできない。そこで、試料溶液1 mLをガラス試験管にとり、窒素気流下で穏やかに溶媒を除去した後、内標準溶液1 mLに転溶したときの回収率を求めた。なお、スキャン回数はそれぞれ32回とし、そのときのS/N比も合わせて表4に示した。

試料溶液100、1,000および5,000 $\mu\text{g/mL}$ (試料中濃度が1、10および50%に相当)の場合、S/N比はそれぞれ120/1以上、1300/1以上および6800/1以上といずれもS/N比は100以上となり、十分なシグナル積分値が得られた。また、回収率は100.0~103.0%、標準偏差は0.2~2.0%と非常に良好であった。転溶法は試験溶液を内標準溶液に転溶するのみと操作が簡単のため、試料中のPAEs濃度が1%以上の試料に対して非常に有効であると考えられた。

一方、試料溶液10 $\mu\text{g/mL}$ の場合、S/N比は15/1以下であり、シグナル積分値は十分ではなかった。そこで、スキャン回数を256回に増やしたが、S/N比は36であった。スキャン回数が256回の場合、測定時間は約5時間かかるが、これ以上スキャン回数を増やしてもS/N比の大幅な改善は期待できないため、試料溶液10 $\mu\text{g/mL}$ には転溶法は適用できないと考えられた。

5) アルミナカートリッジカラムを用いた精

4) 濃縮法による回収率

試料溶液10 $\mu\text{g/mL}$ を10倍濃縮したときの回収率を確認した。試料溶液10 $\mu\text{g/mL}$ 10 mLをガラス試験管にとり、窒素気流下で穏やかに溶媒を除去した後、残渣に内標準溶液1 mLを加えた溶解したときの回収率を求めた。なお、スキャン回数はそれぞれ256回とし、回収率およびS/N比を表5に示した。

S/N比は全て100以上となったため、シグナル積分値は許容可能なレベルとなった。回収率は112.3~124.7% (ストラップ試料についてはBTMSBを内標準物質とした)、標準偏差は0.8~2.2%であった。繰り返し精度は良好であったが、回収率は全体的に大きい値となった。濃縮したことにより試料溶液中に含有された微量な化合物のシグナル積分値も大きくなり定量値に影響を与えたと推測された。

表4 転溶法における回収率およびS/N比

Sample	Conc (%)*	回収率	S/N比
Doll 55	50	101.6 \pm 0.3	6800/1
	10	101.1 \pm 0.2	1400/1
	1	102.0 \pm 0.5	130/1
	0.1	-	15/1
Strap 25	50	101.9 \pm 0.7	7600/1
	10	101.9 \pm 1.1	1500/1
	1	102.3 \pm 0.7	130/1
	0.1	-	12/1
Bath 12	50	100.8 \pm 0.5	7000/1
	10	100.0 \pm 0.3	1300/1
	1	103.0 \pm 2.0	120/1
	0.1	-	14/1

回収率 \pm 標準偏差 (n=3), -: 計算せず

*試料あたりの濃度

表5 濃縮法における回収率およびS/N比

Sample	Conc (%)*	回収率	S/N比
Doll 55	0.1	112.3 \pm 2.2	140/1
Strap 25	0.1	116.0 \pm 2.1**	150/1
Bath 12	0.1	124.7 \pm 0.8	120/1

回収率 \pm 標準偏差 (n=3)

製法による回収率定量はBTMSBを用いた

ゴム製品等の PAEs 試験において共存物を除去するため、アルミナカートリッジカラムを用いた精製法が示されている¹⁰⁾。そこで、10 倍濃縮した試料溶液中の共存物をアルミナカートリッジで除去可能か検討した。

アルミナカートリッジに保持された DEHP はヘキサンの通液では溶離しないが、アセトンを通液することで溶離する¹⁰⁾。そのため、カートリッジにチャージする際の溶液はヘキサンを用いる必要がある。試料溶液 10 µg/mL を 10 倍濃縮した残渣にヘキサン 2 mL を加えたところ、塩化ビニルオリゴマーが析出した。この析出したオリゴマーはカートリッジのつまりの原因となるため、810 ×g で 3 分間遠心し、上清のみを採取したものをカートリッジにチャージした。ヘキサン 10 mL で洗浄後、1~10% (1%ごと) のアセトンを含むヘキサン各 10 mL を通液し、どの画分に DEHP が溶出するか GC/SM を用いて確認した。その結果、1~3% のアセトンを含むヘキサンの画分に約 90% 以上の DEHP が溶出した。そこで、溶離液は 5% のアセトンを含むヘキサンとした。DEHP の回収率を求めたところ、回収率は 97.9~101.2%、標準偏差は 1.0~1.7% と非常に良好な結果が得られた (表 6)。また、スキャン回数を半分の 128 回としても S/N 比は 160 以上となり、測定時間も約半分に短縮できた。これは精製により DEHP 以外の可塑剤をある程度除去でき、それにより NMR 測定においてマトリックス効果の影響が少なくなった

めと考えられた。

これまでの検討は PAEs として DEHP を用いていたため、他の PAEs についても適用可能か検討した。DBP は人形 (DINA および ATBC 含有)、BBP は風呂用玩具 (DEHTP 含有)、DNOP はストラップ (DINCH 含有) および人形、DINP はストラップ、DIDP は風呂用玩具から得られた抽出液からそれぞれ試料溶液を調製した。

その結果、BBP を除き、回収率は 95.9~101.3%、標準偏差は 0.7~2.2% と非常に良好であった。一方、BBP の回収率は 68.7±0.8% 程度であった。BBP は分子内に芳香族環を二つ有するためアルミナカートリッジとの相互作用が強く 5% のアセトンを含むヘキサンでは完全に溶離しなかったと考えられた。そこで 10% のアセトンを含むヘキサンを溶離液としたところ、回収率は 91.2±0.8% と改善が認められた。

以上の結果から、DEHP 以外の PAEs についてもアルミナカートリッジカラムを用いた精製法が適用可能であることが確認された。

4. DART-OT/MS によるスクリーニング法と組み合わせた新たな PAEs 分析法

本研究で開発した DART-OT/MS を用いたスクリーニング法と NMR を用いた定量法を組み合わせた新たな PAEs 分析法を提案し、その分析の手順を以下に示した。

表6 精製法における回収率およびS/N比

Sample	Conc (%)*	回収率	S/N 比	
			スキャン256回	スキャン128回
Doll 55	0.1	101.2 ± 1.8	230/1	170/1
Strap 25	0.1	98.6 ± 1.0	290/1	210/1
Bath 12	0.1	97.9 ± 1.0	200/1	160/1

回収率 ± 標準偏差 (n=3)

*試料あたりの濃度

DART-OT/MS を用いたスクリーニング法により PAEs が検出された試料から、公定法にしたがい試験溶液を調製する。はじめに転溶法により測定溶液を調製し、試料中の含有量が 1%以上であれば、得られた定量値から含有量を求める。一方、転溶法により十分な感度が得られなかった場合、精製法により改めて測定溶液を調製するが、その際スクリーニングによって検出された PAE が BBP であれば溶離液は 10%のアセトンを含むヘキサンを用い、BBP 以外であれば 5%のアセトンを含むヘキサンを用いる。得られた測定溶液を NMR で測定し、得られた定量値から含有量を求めるとともに、0.1%の規格値を超えるかどうかの判定を行う。

これにより、試験溶液の調製頻度が大幅に減少し、試験の手間を減らすことができ、さらに正確な定量値が得られることからの確かな適否判定が可能であると考えられる。

D. 結論

NMR を用いた PVC 製品中の PAEs の正確な定量法を検討した。定量用シグナルにはフタル酸に由来する二つのシグナル、内標準物質には MA、重溶媒にはアセトン- d_6 を選択した。試料中の PAEs 含有量が 1~50%程度であれば、試験溶液を内標準物質を含む重溶媒に転溶するのみの転溶法が有効であり、塩ビオリゴマーや共存可塑剤の影響を受けずに正確に定量可能であった。また、含有量が 0.1%程度の場合、アルミナカートリッジを用いた精製法により正確な定量値が得られた。特に、GC/MS では正確な定量が困難な DINA や DINCH を含有する製品の DNOP や DINP についても正確な定量値が得られることが確認された。したがって、試料中の PAEs の正確な含有量を求める必要がある場合には本法は非常に有用であると考えられた。

また、NMR を用いた定量法は PAEs 標準品

が不要である。そのため、規制対象以外の PAEs にも適用可能であることから、新たな PAEs が検出され、標準品を所有していない場合でも本法により含有量を正確に定量可能であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 伊藤澄夫, 山崎壮, 河村葉子, 西村哲治, 定量 NMR を用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量, 食品衛生学雑誌, 16, 28-33 (2009)
- 2) T. Ohtsuki, K. Sato, Y. Abe, N. Sugimoto, H. Akiyama, Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ^1H NMR, *Talanta*, 131, 712-718 (2015)
- 3) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広, 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 41, 960-970 (2010)
- 4) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H., Application of ^1H -NMR spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of *Coptidis Rhizoma*, *J. Nat. Med.* 65, 262-267 (2010)
- 5) 阿部 裕, 山口未来, 六鹿元雄, 平原嘉親, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠璃, 合田幸広, 河村葉子: DART-TOF/MS を用いたポリ塩化ビニル中の可塑剤の検索およびフタル酸エステルスクリーニング法の検討, 食品衛生学雑誌, 51, 160-169 (2010)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 ‘おもちゃにおけるフタル酸エステルの試験法について’平成 22 年 9 月 6 日 食安発 0906 第 4 号
- 7) CPSIA, Test Method: CPSC-CH-C1001-09.3, Standard Operating Procedure for Determination

of Phthalates (2010)

8) 阿部 裕, 六鹿元雄, 平原嘉親, 河村葉子 :
ポリ塩化ビニル製品中の6種のフタル酸エ
ステル試験法, 食品衛生学雑誌, 52, 309-313
(2011)

9) 阿部 裕, 山口未来, 穂山 浩, 六鹿元雄 :
GC/MS を用いたフタル酸エステル測定にお

ける共存可塑剤の影響, 第51回全国衛生化学
技術協議会年会講演集, p.96-97 (2014)

10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
'おもちゃにおけるフタル酸エステルの試験
法について(別添)おもちゃの可塑化された
材料における6種類のフタル酸エステル試験
法' 平成22年9月6日 食安発0906第4号

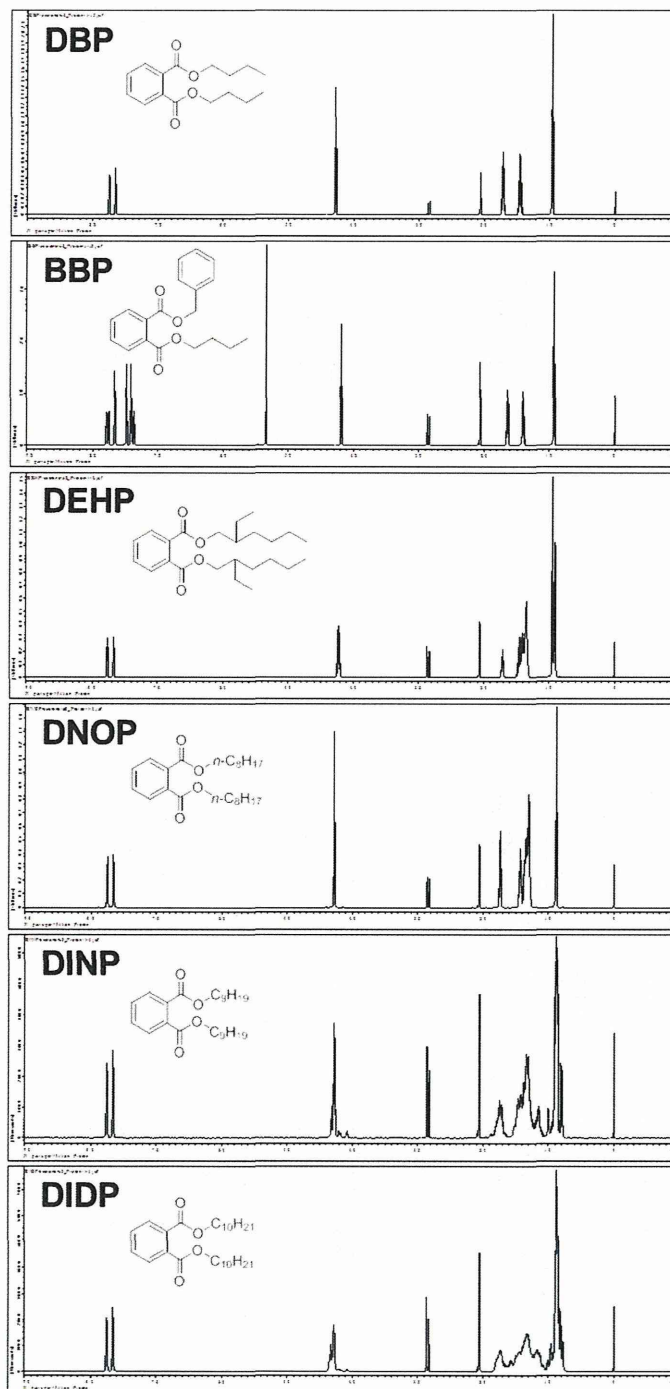


図1-1 6種のPAEsのNMRスペクトル

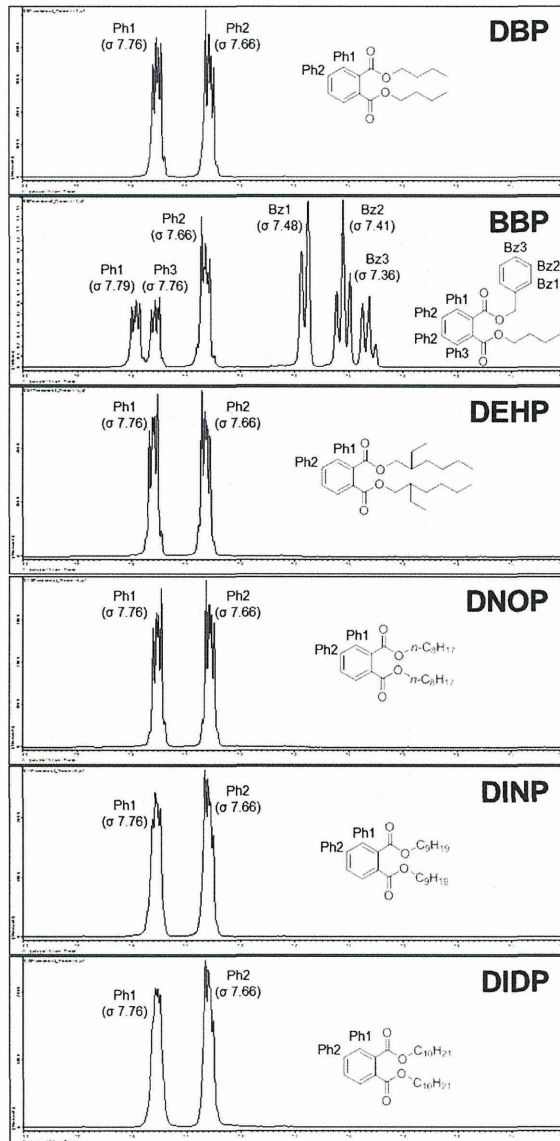


図1-2 6種のPAEsのNMRスペクトル(δ7.0~8.0)

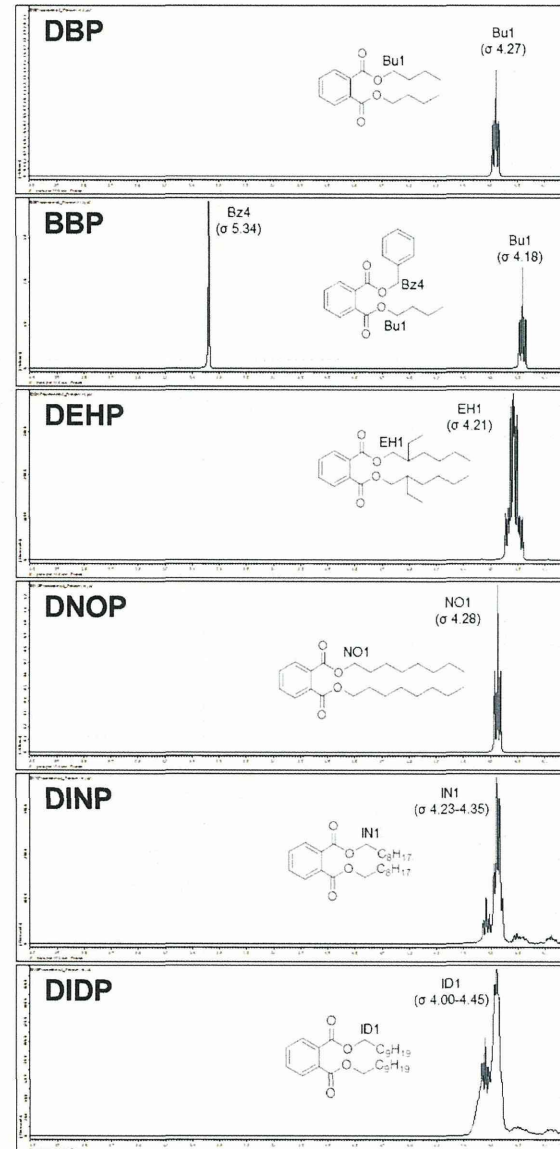


図1-3 6種のPAEsのNMRスペクトル(δ4.0~6.0)

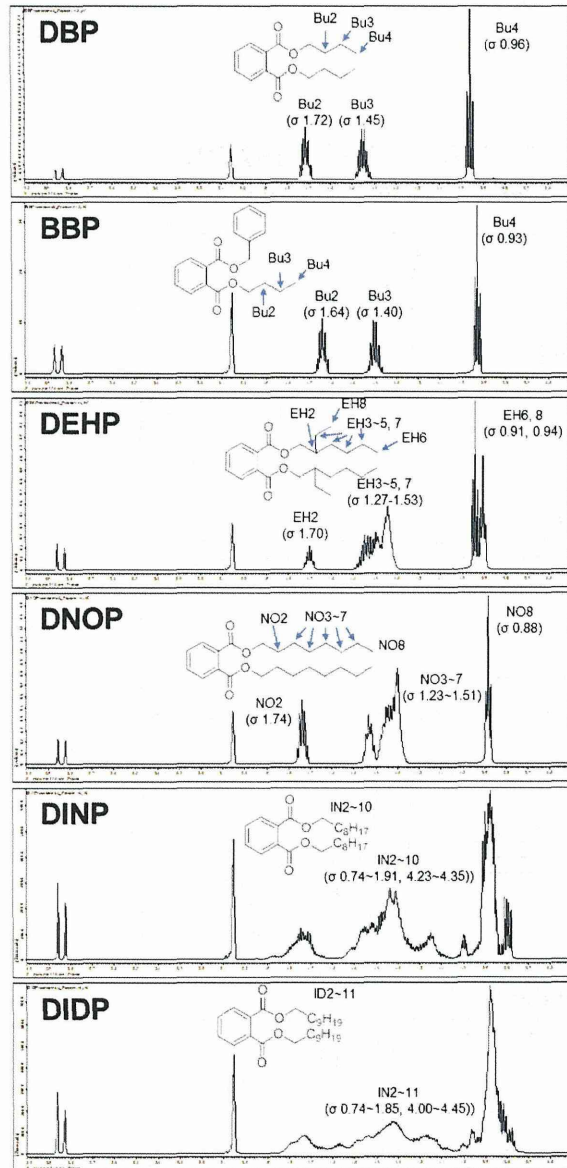


図1-4 6種のPAEsのNMRスペクトル(δ0.0~3.0)

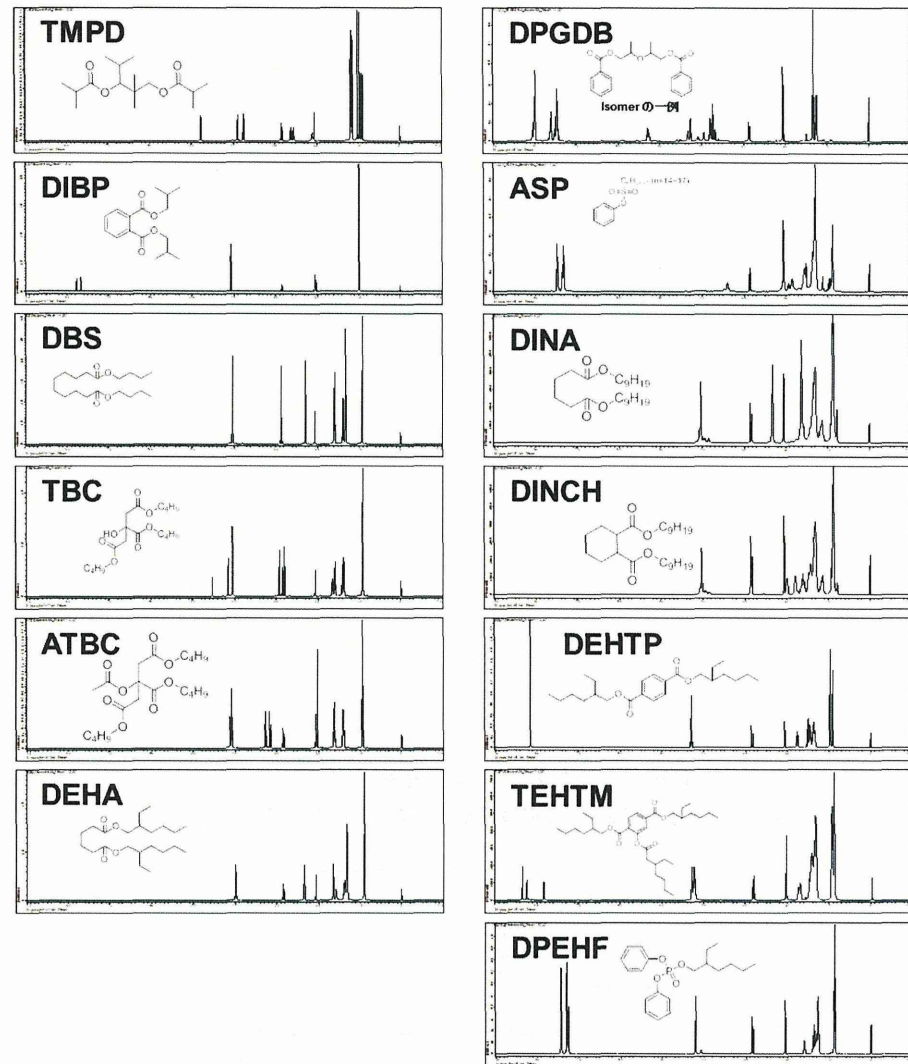


図2 その他の可塑剤のNMRスペクトル

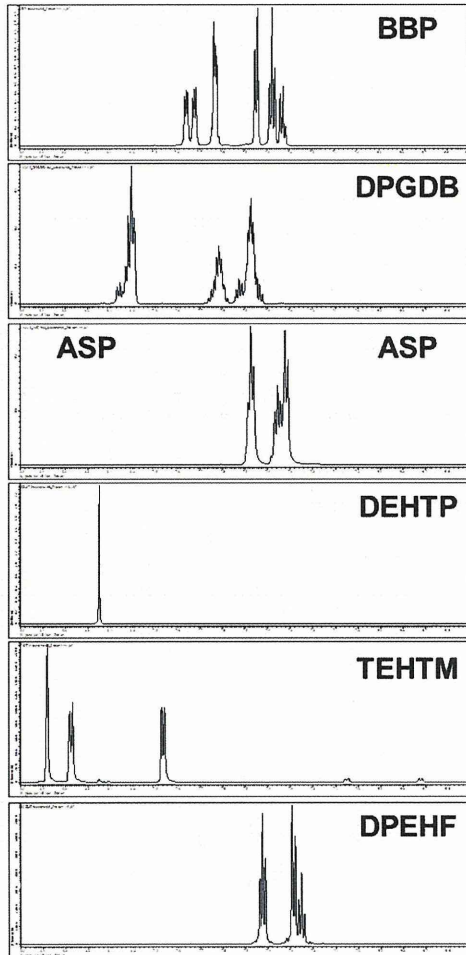


図3-1 芳香族環を有する可塑剤の NMR スペクトル
($\delta 6.5\sim 8.5$ ppm, アセトン- d_6)

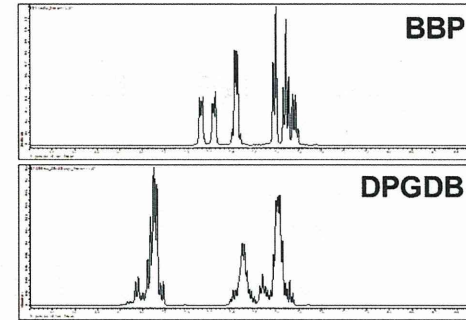


図3-2 BBPおよびDPGDBの NMR スペクトル
($\delta 6.5\sim 8.5$ ppm, メタノール- d_4)