

201522044B

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

# DART-OT/MS および qNMR を用いた 迅速かつ簡易な可塑剤分析法の検討

平成26～27年度 総合研究報告書

平成28(2016)年3月

研究代表者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所

# 目 次

## I. 総合研究報告書

DART-OT/MS および qNMR を用いた迅速かつ簡易な可塑剤分析法の検討・・・・・・・・・・1  
阿部 裕

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

## DART-OT/MS および qNMR を用いた迅速かつ簡易な可塑剤分析法の検討

研究代表者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

合成樹脂やゴム製品には様々な添加剤が使用される。その添加剤の一種である可塑剤は製品に柔軟性を付与するために添加されるが、軟質のポリ塩化ビニル（PVC）製品などでは他の添加剤と比べて添加量が多いことが知られている。そのため、合成樹脂やゴム製の器具・容器包装および乳幼児用玩具に含まれる可塑剤は、食品や唾液を介してヒトが摂取される可能性が高い。また、代表的な可塑剤であるフタル酸エステル（PAEs）の一部には毒性が疑われるものがあるため、我が国では、フタル酸ジブチル（DBP）、フタル酸ベンジルブチル（BBP）、フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）、フタル酸ジ-*n*-オクチル（DNOP）、フタル酸ジイソノニル（DINP）およびフタル酸ジイソデシル（DIDP）の6種のPAEsの乳幼児用玩具への使用が禁止されている。また最近では新たに開発された多種多様の可塑剤が製品に使用されつつある。そのため可塑剤の使用実態を把握するとともにその暴露予測を行うことは、リスク管理および食品衛生上重要かつ急務であると考えられる。しかし、一般的なGCによる可塑剤の分析においては、試験溶液の調製および測定に時間がかかるうえ、含有される可塑剤の種類や量によっては精度よく定量することが困難な場合もある。そこで本研究では、迅速かつ簡易な可塑剤分析法として、「1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発」、「2. 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」、GCによる分析では定量が困難な場合の定量法として、「3. NMR を用いたPVC製品中のPAEsの正確な定量法の開発」を試みた。また、これらを組み合わせて、乳幼児用玩具のPAEs規制に適応したスクリーニング～定量までの一連の流れを構築した。さらに、「4. PVC製玩具の使用可塑剤実態調査」を行い、過去の調査結果と比較し、市販製品中の可塑剤の使用傾向の変化を調べた。

「1. DART-OT/MSを用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法（DART-OT/MS法）の開発」では、試験溶液の調製をせずに試料中の可塑剤のイオン化が可能なDARTイオン源に、OT/MSを接続させたDART-OT/MSを用いて、得られたMSおよびMS/MSスペクトルを組み合わせることで、約40種類の可塑剤を同定可能であることを示した。また、本同定法を用いてPVC製玩具中の可塑剤分析を行ったところ、玩具中に複数使用されている可塑剤のうち、最も使用量が多い主可塑剤を正確に同定可能であり、さらに主可塑剤以外の可塑剤についても1%以上の含有量のものをほぼ同定可能であった。DART-OT/MS法は前処理が不要であり、1試料あたりの測定時間は1分以内と非常に迅速であった。

「2. 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」では、上記で

開発したDART-OT/MS法を改良し、10種類のPAEsの迅速スクリーニング法を新たに開発し、さらにその精度を確認した。10種類のPAEsをより高感度に検出するためにMS/MS測定条件の最適化を行い、10種のPAEsを0.05または0.1%含有するPVC製シートを測定したその結果、標準品と同じMS/MSスペクトルが得られ、PVC製品中のPAEsを正確に検出することができた。さらにPVC製玩具25検体を測定した結果、PAEsを含有する9検体を全て選り出すことができた。また、PAEsを規格値以上含有すると判定する閾値を設定することにより、含有量が0.1%未満のPAEsを検出する頻度を大幅に低減できた。このように、DART-OT/MSによる10種のPAEsのスクリーニング法は迅速、簡便かつ正確であるため、非常に優れた方法であると考えられた。

「3. NMRを用いたPVC製品中のPAEsの正確な定量法の開発」では、はじめにPAEsおよび代表的な可塑剤のNMRスペクトルデータを取集した。その結果から、定量用シグナルとしてPAEsの芳香族環に由来する $\delta$ 7.66および7.76 ppmの二つのシグナルを選択した。また、測定溶媒はアセトン- $d_6$ もしくはメタノール- $d_4$ 、内標準物質はマレイン酸およびBTMSBを用いることとした。PVC製品材質中のPAEs濃度が1~50%の場合は、試験溶液を内標準物質含有の重溶媒に転溶して測定するのみで、回収率100.0~103.0%、標準偏差0.2~2.0%と真度、精度ともに非常に良好な結果が得られた。一方、PAEs濃度が0.1%の場合は、十分な感度が得られなかったため、アルミナカートリッジカラムを用いた簡易精製を行うこととした。これにより、回収率は91.2~101.3%、標準偏差は0.7~2.2%と良好な結果が得られた。本法はGC/MSよりも真度・精度ともに良好な方法であると考えられた。

上記1~3において開発した方法を組み合わせることにより、PAEs規制に適応したスクリーニング~定量までの一連の流れを構築した。これにより乳幼児用玩具のPAEs試験における試験を実施する検体数を減少させることができ、GC分析法では定量が困難と考えられる場合の的確な適否判定が可能となった。

「4. PVC製玩具の使用可塑剤実態調査」では、GC/MSを用いてPVC製玩具約500検体の可塑剤使用実態調査を行うとともに、2009年度の調査結果と比較し、市販製品中の可塑剤の使用傾向の変化を調べた。約500検体から15種類の可塑剤が検出されたが、いずれもこれまでに検出報告があるものであった。DEHTPの検出率が最も高く、約65%の試料から検出された。指定おもちゃに限定してみてもDEHTPの検出率が最も高く、2009年度と比べ大幅に上昇していたが、含有量は減少していた。その他の可塑剤の検出率は同程度もしくは低下傾向にあったが、含有量はDEHTPと同様に減少していた。一方、指定おもちゃ以外でもDEHTPが最も多く検出され、検出率も2009年度と比べて増加していたが、含有量は低下していた。また、PAEsの検出率は1/3以下に減少していた。このようにPVC製玩具に使用される可塑剤は、5年前と比べ種類に大きな違いはなかったが、DEHTPの使用頻度が大幅に上昇しており、PAEsの使用頻度は大幅に低下していた。また、可塑剤の使用量は全体的に減少していることが明らかとなった。

研究協力者

六鹿元雄：国立医薬品食品衛生研究所

山口未来：国立医薬品食品衛生研究所

石附京子：国立医薬品食品衛生研究所

大槻 崇：国立医薬品食品衛生研究所  
穂山 浩：国立医薬品食品衛生研究所  
佐藤恭子：国立医薬品食品衛生研究所  
木嶋麻乃：共立女子大学  
伊藤裕才：共立女子大学

## A. 研究目的

合成樹脂やゴム等には様々な添加剤が使用されるが、その中でも柔軟性を付与するために添加される可塑剤は特に使用量が多く、例えば軟質ポリ塩化ビニル（PVC）製品では、最大で 50%程度使用されるものもある<sup>1,4)</sup>。そのため、合成樹脂やゴム製の器具・容器包装および乳幼児用玩具に含まれる可塑剤は、食品や唾液を介してヒトが摂取する可能性が高い。また、代表的な可塑剤であるフタル酸エステル（PAEs）の一部には毒性が疑われるものがあり<sup>5-7)</sup>、そのため我が国では、フタル酸ジブチル（DBP）、フタル酸ベンジルブチル（BBP）、フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）、フタル酸ジ-*n*-オクチル（DNOP）、フタル酸ジイソノニル（DINP）およびフタル酸ジイソデシル（DIDP）の 6 種の PAEs の乳幼児用玩具への使用が禁止されている（含有量として 0.1%未満）<sup>8)</sup>。また最近では新たに開発された多種多様の可塑剤が製品に使用されつつある<sup>2),4)</sup>。そのため、製品中の可塑剤を分析し、使用実態を把握することはリスク管理および食品衛生上重要である。

一般的に PAEs の分析は、抽出法または溶解法により試験溶液を調製後、ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器（GC-FID）等で測定する。試験溶液の調製法である抽出法には、アセトン・ヘキサン混液による浸漬抽出法<sup>9)</sup>やソックスレー抽出法<sup>10)</sup>やマイクロウエーブ抽出法<sup>11)</sup>などがあるが、抽出操作には半日から一晩程度かかる。一方の溶解法<sup>12)</sup>は、試料をテトラヒドロフランなどの有機溶媒に溶解

させた後、メタノールやエタノールなど高極性の溶媒を徐々に加えることにより溶解した合成樹脂のポリマーのみを析出させ、これをろ過して取り除いたものを試験溶液とする。試験溶液の測定は GC-FID もしくは GC-質量分析計（GC/MS）が用いられるが、DINP や DIDP を測定する場合は 30 分程度を要する。このように、PAEs の分析は操作が煩雑で時間がかかる場合があり、多くの検体の試験を行う機関では、迅速かつ簡便な分析法やスクリーニング法の開発が求められている。また、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<sup>13)</sup>。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ン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<sup>14)</sup>。

近年開発された実時間直接分析（direct analysis in real time, DART）イオン化装置は、ヘリウムガスをニードル電極の放電によりプラズマ化して励起状態の中性気体分子とし、これを試料に直接作用させることにより大気圧下で瞬時に目的物質をイオン化できる<sup>15)</sup>。この装置を質量分析計に接続した DART-MS は、試料を DART イオン化装置と質量分析計の間にかざすだけで、前処理を行うことなく含有化合物の MS スペクトルを迅速かつ簡単に得ることができる。液体や固体等の様々な

試料の分析が可能であり、近年では、医薬品<sup>16)</sup>、違法薬物<sup>17)</sup>、植物<sup>18)</sup>、培養細胞<sup>19)</sup>などへの適用例が報告されている。

また、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 <sup>1</sup>H-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<sup>20-23)</sup>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。

そこで本研究では、「1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発」において、MS および MS/MS 同時測定が可能なイオントラップ型 MS であるオービトラップ (OT) /MS を DART イオン源に接続させた DART-OT/MS を用いた可塑剤の簡易かつ迅速同定法を検討した。さらに、「2. 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」において、米国で新たに規制対象に追加予定<sup>24)</sup>であるフタル酸ジイソブチル (DIBP)、フタル酸ジ-*n*-ペンチル (DNPenP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP) およびフタル酸ジ-*n*-ヘキシル

(DNHexP) の 4 種を追加した 10 種の PAEs を対象としたスクリーニング法の開発を行った。また、「3. NMR を用いた PVC 製品中の PAEs の正確な定量法の開発」において、NMR を用いた PVC 中の PAEs の正確な定量方法を検討するとともに、DART-OT/MS を用いた PAEs 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。さらに、「4. PVC 製玩具の使用可塑剤実態調査」を行い、市販 PVC 製玩具約 500 検体の使用可塑剤実態調査を行い、過去の調査結果と比較し、市販製品中の可塑剤の使用傾向の変化を調べた。

## B. 研究方法

### 1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発

#### 1) 試料

DART-OT/MS による可塑剤同定法の評価用：以前の研究<sup>4)</sup>により可塑剤含有量が既知の PVC 製玩具 25 検体。

#### 2) 試薬等

##### ①標準品

可塑剤標準品：本研究で使用した可塑剤標準品の化学名、略号、CAS No. および純度を表 1 に示した。

##### ②標準溶液

可塑剤標準溶液：各可塑剤標準品 10 mg をとり、アセトンを加えて各 10 mL とした (各 1,000 μg/mL)。

##### ③その他試薬類

アセトン：残留農薬・PCB 分析用 シグマアルドリッチ社製

ヘキサン：残留農薬・PCB 試験用 和光純薬工業社製

#### 3) 装置および器具

DART イオン源：DART-SVP (エーエムアール社製)

表1 本研究で用いた可塑剤の化学名、略号もしくは製品名、CAS番号、分子式、分子量、販売元および純度

No.	化学名	略号もしくは製品名	CAS 番号	分子式	分子量	販売元*	純度
1	Dimethyl phthalate	DMP	131-11-3	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194	A	>99
2	Diethyl phthalate	DEP	84-66-2	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222	A	>98
3	Di- <i>n</i> -propyl phthalate	DPP	131-16-8	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	250	A	>98
4	Di- <i>n</i> -butyl phthalate	DBP	84-74-2	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278	B	>99
5	Diisobutyl phthalate	DIBP	84-69-5	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278	A	>98
6	Di(2-methoxyethyl) phthalate	DMEP	117-82-8	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	282	A	>95
7	Benzyl butyl phthalate	BBP	85-68-7	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	312	B	>99
8	Dicyclohexyl phthalate	DCHP	84-61-7	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	330	A	>99
9	Diisooctyl Phthalate	DIHP	41451-28-9	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	362	A	>95
10	Di(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	117-81-7	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	B	>99
11	Di- <i>n</i> -octyl phthalate	DNOP	117-84-0	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	B	>99
12	Diisooctyl phthalate	DIOP	27554-26-3	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	C	>99
13	Diisononyl phthalate	DINP	28553-12-0	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	418	B	>98
14	Dinonyl phthalate	DNP	84-76-4	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	418	A	>95
15	Diisodecyl phthalate	DIDP	26761-40-0	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	446	A	-
16	Di- <i>n</i> -propyl adipate	DPA	106-19-4	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230	A	>99
17	Diisopropyl adipate	DIPA	6938-94-9	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230	A	>97
18	Di- <i>n</i> -butyl adipate	DNBA	105-99-7	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	258	A	>99
19	Diisobutyl adipate	DIBA	141-04-8	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	258	A	>99
20	Dibenzyl adipate	DBA	2451-84-5	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	326	A	>95
21	Di- <i>n</i> -alkyl adipate (C=6, 8, 10)***	DAA	-	-	370	A	-
22	Di(2-ethylhexyl) adipate	DEHA	103-23-1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	370	A	>98
23	Heptylnonyl adipate (C=7, 9)	HNA	68515-75-3	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	370	A	-
24	Di- <i>n</i> -octyl Adipate	DNOA	123-79-5	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	370	D	>99
25	Diisononyl adipate	DINA	33703-08-1	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	398	B	-
26	Diisodecyl adipate	DIDA	27178-16-1	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	426	A	-
27	Dibutyl sebacate	DBS	109-43-3	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	314	B	>97
28	Di(2-ethylhexyl) sebacate	DEHS	122-62-3	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	426	B	>95
29	Neopentyl Glycol Dibenzoate	NPGDB	4196-89-8	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	312	A	>98
30	Triethylene glycol bis(2-ethylhexanoate)	TEGDEH	94-28-0	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub>	402	E	>97
31	Tributyl Citrate	TBC	77-94-1	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	360	A	>98
32	<i>o</i> -Acetyl tributyl citrate	ATBC	77-90-7	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	402	B	>90
33	Cresyl diphenyl phosphate	CDP	26444-49-5	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> P	340	A	>93
34	Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate	DPEHF	1241-94-7	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	362	A	>90
35	Di(2-ethylhexyl) azelate	DEHZ	103-24-2	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	412	B	>70
36	Di- <i>n</i> -butyl maleate	DBM	105-76-0	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	228	A	>95
37	2,2,4-Trimethyl-1,3-Pentanediol diisobutyrate	TMPD	6846-50-0	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	286	A	>97
38	Diaceetyl lauroyl glycerol (C=8, 10, 12, 14, 16, 18)***	DALG	30899-62-8	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	358	A	-
39	1,2,3,6-Tetrahydrophthalic Acid Di(2-ethylhexyl) Ester	DEHTHP	2915-49-3	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	394	A	>97
40	Bis(2-ethylhexyl) terephthalate	DEHTP	6422-86-2	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	D	>98
41	Bis(2-ethylhexyl) Isophthalate	DEHIP	137-89-3	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	F	100
42	Diisononyl 1,2-Cyclohexane dicarboxylate	DINCH	166412-73-8	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	424	G	-
43	Tris(2-ethylhexyl) Trimellitate	TOTM	3319-31-1	C <sub>33</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	546	A	>95

各テーマごとに適宜必要な可塑剤を選択して用いた

\*A) Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., B) Wako Pure Chemical Industries, Ltd., C) Aldrich Chemical Co., Inc., D) AK Scientific, Inc., E) Kanto Chemical Co. Ltd., F) SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS, INC., G) Provided by a plastisol producing company.

\*\*強度比が5%以上のもの(最大10)

\*\*\*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。

太字は分子イオンビークに相当するもの

OT-MS : Q Exactive (ThermoFisher Scientific 社製)

GC/MS : 6890 (GC), 5975 (MSD) (Agilent Technologies 社製)

ガラスキャピラリー: 1.6×100 (片封じ) (エーエムアール社製)

#### 4) DART-OT/MS による測定

##### ①DART 測定条件

イオン源温度: 250°C

ガス: ヘリウム (流速 3.5 mL/min)

測定モード: ポジティブモード

##### ②OT/MS 測定条件

キャピラリー温度: 200°C

キャピラリー電圧 25 V

チューブレンズ電圧: 120 V

スキマー電圧: 26 V

スプレー電圧: 1 kV

シースガス流量: 0

AUX ガス流量: 0

スイープガス流量: 0

測定方法: Full MS および Targeted-MS<sup>2</sup> (MS/MS)

Full MS および Targeted-MS<sup>2</sup> 測定条件: 表 2

##### ③測定方法

測定方法を図 1 に図示した。可塑剤標準溶液はガラスキャピラリーの先端に溶液を付着させ、また PVC 製玩具は約 1~2 mm 幅の小片としてピンセットでつまみ、DART イオン源と OT/MS の間に約 5 秒間かざした。これを 3 もしくは 5 回繰り返した。なお、測定日毎に試料測定前に装置のキャリブレーションを行った。

##### ④データ解析

繰り返し測定により得られたトータルイオンカレント (TIC) うち最大のピークを選択し、このピークを平均化して MS スペクトルを得た。また、このピークの前後約 5 秒間 MS ス

ペクトルをバックグラウンドとして減算した。

表 2 DART-OT/MS 測定条件

MS測定条件		
一般条件 (General)		
Polarity	positive	
In-source CID	0.0 eV	
MS 条件 (Full-MS)*		
Microscans	1	
Resolution	70000	
AGC target	3.00E+06	
Maximum IT	200 ms	
Scan range (m/z)	100 - 1500	
Spectrum data typ	Profile	
MS/MS 測定条件		
一般条件 (General)		
Polarity	positive	
In-source CID	0.0 eV	
Default charge sta	2	
Inclusion	on	
MS/MS 条件 (Targeted-MS <sup>2</sup> )		
Microscans	2	
Resolution	17500	
AGC target	2.00E+06	
Maximum IT	100 ms	
MSX count	1	
Isolation window	4.0 m/z	
Fixed first mass	-	
NCE	35	
Stepped NCE	-	
Spectrum data typ	Profile	
Target および CE (inclusion list)		
Target m/z	CE (%)	目的
205.0896*	40	DBP or DIBP の検出
231.1586	10	DPA と DIPA の判別
259.1899	10	DNBA と DIBA の判別
279.1639*	10	DBP or DIBP の検出
313.1487*	30	BBP の検出
371.3152	10	DEHA と DNOA の判別
391.2912*	10	DEHP, DNOP, DIOP,
408.3181*	10	DEHTP, DEHIP の判別
419.3150*	40	DINP と DNP の判別
427.3778	10	DIDA と DEHS の判別
447.3547*	20	DIDP の検出

\*常時測定



## 2. 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

### 1) 試料

PAEs 含有 PVC 製シート：10 種の PAEs を 0.05 もしくは 0.1%含有する軟質もしくは硬質 PVC 製シート。信越化学工業株式会社 塩ビ・高分子材料研究所にて作製した。

### 2) 試薬等

#### ①標準品

PAEs (DBP, DIBP, DNPenP, BBP, DCHP, DNHexP, DEHP, DNOP, DINP および DIDP) 標準品：全てフタル酸エステル試験用 和光純薬工業株式会社製

#### ②標準溶液

PAEs 標準原液:PAEs 標準品 10 mg をとり、アセトンを加えて各 10 mL とした (各 1,000 µg/mL)。

#### ③その他試薬類

テトラヒドロフラン (THF)：安定剤不含、HPLC 用 和光純薬工業社製

アセトンおよびヘキサンは < 1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発 > と同じ

### 3) 装置および器具

DART-OT/MS およびガラスキャピラリーは < 1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発 > と同じ

### 4) DART-OT/MS による測定

①DART 測定条件、②OT/MS 測定条件および③測定方法は < 1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発 > と同じ

#### ④データ解析

3 もしくは 5 回の繰り返し測定により得られたトータルイオンカレントグラム (TIC) のピークをそれぞれ平均化し、得られた MS/MS スペクトルから、それぞれの TIC ピークの前後約 5 秒間の MS/MS スペクトルをバックグラ

ンドとして減算した。

定性は PVC 製シートおよび玩具から得られた MS/MS スペクトルと標準溶液の MS/MS スペクトルを比較して行った。また、検出レベルの設定に用いたピーク強度は、得られた MS/MS スペクトルで最も高強度のプロダクトイオンのピーク強度を用いた。

## 3. NMR を用いた PVC 製品中の PAEs の正確な定量法の開発

### 1) 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。

### 2) 試薬等

#### 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*<sub>4</sub> (BTMSB-*d*<sub>4</sub>) 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) が付与されたものを用いた。

#### ③標準溶液

NMR 用内標準溶液：MA 5 mg および BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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*<sub>6</sub> 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。

#### ④その他試薬

重アセトン- $d_6$ および重メタノール- $d_4$  : 関東化学社製

アセトンおよびヘキサンは < 1 . DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発 > と同じ

#### 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

##### ①NMR 測定条件

$^{13}\text{C}$  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 :  $90^\circ$

Pulse delay : 60 s ( $>5 \cdot T_1$ )

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

##### ②NMR データ解析

得られた FID データを以下のウイ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。

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

#### ③PAEs 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

#### 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  $40^\circ\text{C}$  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 $\mu\text{g/mL}$ ) の調製

・10  $\mu\text{g/mL}$  : 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。

・100  $\mu\text{g/mL}$  : DEHP 標準品 1 mg を量り、玩具抽出液を加えて 5 mL とした。

・1,000  $\mu\text{g/mL}$  : DEHP 標準品 5 mg を量り、玩具抽出液を加えて 5 mL とした。

・5,000  $\mu\text{g/mL}$  : 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

・測定溶液 (100, 1,000 および 5,000  $\mu\text{g/mL}$ ) : 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。

・測定溶液 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) : 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  $\times g$  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  
 $W_{\text{PAE}}$  = 試料溶液中の PAE 濃度 (mg/mL)  
 $W_{\text{MA}}$  = MA の秤量値 (mg)  
\*BTMSB を用いた場合は MA を全て BTMSB に変更

## 4. PVC 製玩具の使用可塑剤実態調査

### 1) 試料

PVC 製玩具 508 検体を用いた。これらは、2014 年 8 月～2015 年 1 月に東京都内、神奈川県内および茨城県内の乳幼児用品店、百貨店、スーパーマーケット、玩具店、百元ショップ等で購入した。代表的なものの写真を図 2 に

示した。

内訳は、指定おもちゃおよびその部品が 295 検体、指定外おもちゃおよびその部品 (以降、指定外おもちゃとする) が 213 検体であった。なお、「指定おもちゃ」とは、「乳幼児が接触することによりその健康を損なうおそれがあるものとして厚生労働大臣の指定するおもちゃ」のことである。本研究では、対象年齢 5 歳以下かつスポーツ用品を除いたものはすべて指定おもちゃに分類した。

玩具の種類、色、指定おもちゃもしくは指定外おもちゃの区別、対象年齢、製造国、含有可塑剤に関する表示および ST (Safety Toy) マークの有無を表 3 に示した。なお、ST マークとは (一社) 日本玩具協会の自主基準である玩具安全 (ST) 基準に合格した製品に付されるマークである。

### 2) 試薬等

#### ①標準品

可塑剤標準品 : 本研究で使用した可塑剤標準品の化学名、略号、CAS 番号および純度を表 1 に示した。

#### ②標準溶液

可塑剤混合標準溶液 : 各可塑剤標準品をアセトンで溶解して 1,000  $\mu\text{g/mL}$  とした。これらを適宜混合し、アセトンで 0.05~50  $\mu\text{g/mL}$  に希釈したものを可塑剤混合標準溶液とした。

### 3) 装置および器具

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) : 6890N Network GC System, 5975 inert Mass Selective Detector もしくは 7890A GC System, 5975C inert XL MSD with Triple-Axis Detector 以上 Agilent Technologies 社製

恒温器 : DESK-TOP TYPE HI-TEMP. CHAMBER ST120 ESPEC 社製

#### 4) GC/MS 測定条件

カラム : DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚

0.25  $\mu\text{m}$ 、Agilent Technologies 社製)、カラム温度：100°C→20°C/min→320°C (10 min)、注入口温度：250°C、トランスファーライン温度：280°C、キャリアーガス：ヘリウム 1.0 mL/min (定流量)、注入量：1.0  $\mu\text{L}$ 、注入モード：スプリットレス、イオン化電圧：70eV、測定モード：同定はスキャンモード ( $m/z$  50~800)、定量は Selected Ion Monitoring (SIM) モードにより測定した。本条件における各可塑剤の保持時間、定量イオン、確認イオンおよび定量下限を表 1 に示した。

#### 5) 試験溶液の調製

細切した試料 0.25 g を精秤して 50 mL 容ガラス遠沈管に採り、アセトン・ヘキサン混液 (3:7) 15 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 25 mL 容メスフラスコにあつめ、アセトンを加えて定容したものを定性用試験溶液とした。さらにこの液 10  $\mu\text{L}$  をとり、アセトンを 1 mL 加え 100 倍に希釈したものを定量用試験溶液とした。

#### 6) 可塑剤の定性および定量

##### ①定性

定性用試験溶液をスキャンモードで測定し、

検出されたピークの MS スペクトルを我々が所有する可塑剤データベース (約 60 種類の可塑剤のマススペクトルが保存) と比較した。MS スペクトルが一致した場合は、さらに可塑剤標準品と保持時間を比較して確認した。MS スペクトルおよび保持時間が一致した場合、当該可塑剤を含有していると判定した。

##### ②定量

0.05~50  $\mu\text{g/mL}$  の可塑剤混合標準溶液を SIM モードで測定し、各定量イオンのピーク面積から絶対検量線法により検量線を作成した。

定量用試験溶液を同様に GC/MS の SIM モードで測定し、各定量イオンのピーク面積から定量用試験溶液中の各可塑剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) を求めた。ただし、5  $\mu\text{g/mL}$  以下の場合には 0.05~5  $\mu\text{g/mL}$  の検量線を用いて再度定量した。得られた定量用試験溶液中の可塑剤濃度から以下の式にしたがい試料中の可塑剤含有量を算出した。

$$\begin{aligned} \text{試料中の可塑剤含有量 } (\mu\text{g/g}) = \\ \text{定量用試験溶液中の可塑剤濃度} \\ (\mu\text{g/mL}) \times 25 \times 100 / \text{試料重量 (g)} \end{aligned}$$

## C. 研究結果と考察

### 1. DART-OT/MS を用いた製品中の可塑剤の迅速かつ簡易な同定法の開発

#### 1) MS および MS/MS スペクトルによる可塑剤の同定

図3に代表的な可塑剤標準品の MS スペクトルを、表4に検出されたイオンのうち相対強度比が5%以上のものを強度順に最大5個示した。

本研究で測定対象としたほとんどの可塑剤で、分子量に相当する  $[M+H]^+$  もしくは  $[M+NH_4]^+$  のイオンが検出された。したがって、分子量からその可塑剤を容易に同定可能であった。また、分子量に相当するイオンが検出しなかった可塑剤ではそれぞれに特徴的なフラグメントが検出されたため、これらも容易に同定可能であった。

一方、例えば DBP と DIBP、DNP と DINP のように、結合している側鎖の構造がわずかに異なるだけの構造異性体の可塑剤では、MS スペクトルにほとんどない差がため同定は困難であった(図3)。そこで、構造異性体の可塑剤についてはそれぞれ特徴的な MS/MS スペクトルが得られるような MS/MS 条件を設定した。設定した MS/MS 条件を表2に示した。いずれの構造異性体の場合も、異なるプロダクトイオンが検出されたり、それらのイオン強度比が異なっていた。したがって、構造異性体が検出された場合も MS/MS スペクトルにより同定可能であることが明らかとなった。

#### 2) 可塑剤の同定法の評価

決定した DART-OT/MS を用いた可塑剤同定法により PVC 製玩具中に含有される可塑剤の同定が正しく行えるか評価した。試料には以前の GC/MS を用いた調査<sup>4)</sup>において含有する可塑剤が判明している PVC 製玩具 25 検体を用いた。

DART-OT/MS による同定法で検出された可塑剤のうち、GC/MS で定量下限以上だったもの、定量下限未満だったもの、DART-OT/MS による同定法で不検出だった可塑剤のうち、GC/MS で定量下限以上だったものを表5にまとめた。

DART-OT/MS により 16 種類の可塑剤が重複を含めて 119 検体検出した。このうち、86 検体 ( $86/119 = 72\%$ ) は GC/MS でも検出しており、正しく同定できた。一方残りの 28% は GC/MS では検出限界未満のものが検出された。その原因は、DART-OT/MS が GC/MS に比べ高感度であるためと推測された。

それに対して、GC/MS では定量下限以上であったが、DART-OT/MS では不検出だったものが 15 検体あった。しかし、これらの含有量はいずれも 1%未満であり、主可塑剤として使用されたものではないと推測された。

以上のように、DART-OT/MS では PVC 製品中の主可塑剤を正確に同定可能であることが確認された。

### 2. 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

#### 1) MS/MS 測定条件

10 種の PAEs を見逃すことなくかつ正確に検出する必要があることから、それぞれの PAE に特徴的かつ高強度な MS/MS スペクトルが得られる最適なプリカーサーイオン (PI) およびコリジョンエネルギー (CE) を設定した。さらに、最適化した MS/MS 条件で 5 回繰り返して測定したときの各プロダクトイオン強度比の平均値と RSD (%) を表6にまとめた。いずれも PI は分子イオン ( $[M+H]^+$ )、CE は 10 もしくは 20%が最適であり、繰り返しのよってもイオン強度比はほぼ一定であった。また、代表的な MS/MS スペクトルを図4

表4 DART-OT/MS測定において検出したイオンとその強度比

No.	略号もしくは 製品名	DART-OT/MSで検出されたイオンおよびその強度比*			
1	DMP	195.07 (100)	163.04 (85)	196.07 (11)	164.05 (8)
2	DEP	223.10 (100)	177.06 (33)	149.03 (13)	224.10 (13)
3	DPP	251.13 (100)	149.03 (51)	191.07 (17)	252.14 (16)
4	DBP	279.16 (100)	149.03 (44)	280.17 (17)	205.09 (6)
5	DIBP	279.16 (100)	149.03 (26)	280.17 (17)	
6	DMEP	300.15 (100)	283.12 (78)	207.07 (18)	301.15 (16) 284.13 (12)
7	BBP	313.15 (100)	330.18 (24)	149.03 (22)	314.15 (21) 91.06 (13)
8	DCHP	331.20 (100)	149.03 (23)	332.20 (22)	
9	DIHP	363.26 (100)	364.26 (25)	149.03 (6)	
10	DEHP	391.29 (100)	392.29 (27)	149.03 (11)	798.59 (7)
11	DNOP	391.29 (100)	392.29 (27)	149.03 (19)	
12	DIOP	391.29 (100)	392.29 (26)	405.31 (15)	
13	DINP	419.32 (100)	420.33 (28)	421.33 (5)	
14	DNP	419.32 (100)	420.33 (28)		
15	DIDP	447.35 (100)	448.36 (31)	461.37 (12)	449.36 (5)
16	DPA	231.16 (100)	248.19 (33)	232.17 (13)	171.10 (10)
17	DIPA	231.16 (100)	248.19 (28)	232.17 (13)	
18	DNBA	259.19 (100)	276.22 (27)	260.20 (15)	185.12 (6)
19	DIBA	259.19 (100)	276.22 (21)	260.20 (15)	
20	DBA	344.19 (100)	327.16 (39)	181.10 (25)	345.19 (22) 328.17 (8)
21	DAA	315.26 (100)	343.29 (51)	371.32 (41)	332.29 (38) 360.32 (21)
22	DEHA	371.32 (100)	388.35 (38)	372.33 (24)	389.35 (9) 758.66 (6)
23	HNA	371.32 (100)	343.29 (88)	388.35 (36)	399.35 (30) 360.32 (28)
24	DNOA	371.32 (100)	388.35 (27)	372.33 (24)	389.35 (7)
25	DINA	399.35 (100)	416.38 (37)	400.36 (27)	417.38 (10)
26	DIDA	427.39 (100)	444.41 (50)	428.39 (29)	445.42 (14) 441.40 (14)
27	DBS	315.26 (100)	332.29 (41)	316.26 (20)	333.29 (8) 646.54 (5)
28	DEHS	427.39 (100)	444.41 (34)	428.39 (28)	445.42 (10) 443.38 (6)
29	NPGBD	313.15 (100)	330.18 (64)	191.11 (58)	314.15 (21) 331.18 (13)
30	TEGDEH	403.31 (100)	420.34 (70)	171.14 (31)	404.32 (25) 421.34 (17)
31	TBC	361.23 (100)	378.26 (39)	362.23 (20)	379.26 (8)
32	ATBC	403.24 (100)	404.24 (22)	420.27 (13)	
33	CDP	341.10 (100)	327.08 (93)	355.12 (43)	358.13 (34) 344.11 (32)
34	DPEHF	251.05 (100)	363.18 (61)	380.21 (58)	725.35 (20) 364.18 (13)
35	DEHZ	413.37 (100)	414.37 (27)	430.40 (26)	431.40 (7)
36	DBM	229.15 (100)	230.15 (13)		
37	TMPD	304.25 (100)	287.23 (55)	199.17 (53)	305.26 (18) 288.23 (10)
38	DALG	159.07 (100)	236.12 (30)	299.23 (26)	376.28 (25) 243.16 (10)
39	DEHTHP	395.32 (100)	396.33 (26)	153.06 (5)	
40	DEHTP	391.28 (100)	408.31 (99)	279.16 (94)	167.03 (88) 781.56 (37)
41	DEHIP	408.32 (100)	167.04 (55)	409.32 (27)	279.16 (20) 391.29 (15)
42	DINCH	425.37 (100)	426.37 (28)	442.40 (5)	
43	TOTM	547.41 (100)	548.41 (37)	305.14 (11)	549.42 (7) 217.18 (5)

\*強度比が5%以上のもの(最大5)

太字は分子イオンピークに相当するもの

表5 DART-OT/MSによる可塑剤同定の結果

可塑剤	DART-OT/MS	検出		不検出数	含有量 (%) <sup>2</sup>
	GC-MS <sup>1</sup>	> LOQ	< LOQ	> LOQ	
		検出数	検出数	不検出数	
TMPD		18	4	3	0.10, 0.11, 0.19
ATBC		11	1	1	<0.01
TBC		9	2	1	0.26
DEHP		7	3	0	-
DINP		6	4	0	-
DBP		5	3	0	-
DINCH		3	5	0	-
DIBP		6	1	2	0.04, 0.05
DIBA		1	6	0	-
DEHTP		6	0	5	<0.01 (3検体), 0.13, 0.98
DINA		5	1	0	-
TOTM		3	0	1	0.09
DIDP		1	2	0	-
DALG		1	1	0	-
BBP		1	0	0	-
DBS		1	0	1	<0.01
DNOP		0	0	0	-
DEHS		0	0	1	<0.01
Total		86	33	15	-

<sup>1</sup> LOQ: Limit of quantification (DINP, DINCH, DINA: 0.03 %, その他: 0.01%)<sup>2</sup> <0.01: 検出下限~0.01%

赤字は規制対象のフタル酸エステルを示した

表6 DART-MS/MS 測定における各 PAEs から検出されたプロダクトイオンの強度および強度比

PAE	プリカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	NCE	プロダクトイオン 1			プロダクトイオン 2			プロダクトイオン 3			特徴的なプロダクトイオン		
			<i>m/z</i>	イオン強度		<i>m/z</i>	イオン強度比		<i>m/z</i>	イオン強度比		<i>m/z</i>	イオン強度比	
				平均値	RSD		平均値	RSD		平均値	RSD		平均値	RSD
DBP	279.158	10	149.02	4.85E+08	61.9	205.09	10.8	3.6	-	-	-	-	-	-
DIBP	279.158	10	149.02	3.92E+08	38.2	57.07	14.4	3.5	205.09	5.5	4.6	-	-	-
DNPenP	307.189	10	149.02	2.48E+08	54.1	219.10	8.9	3.9	-	-	-	-	-	-
BBP	313.143	10	91.06	1.42E+08	47.0	149.02	60.9	3.0	205.09	11.9	9.9	-	-	-
DCHP	331.189	20	167.04	4.13E+08	48.3	149.02	75.7	3.2	249.11	22.3	1.2	-	-	-
DNHexP	335.221	10	149.02	3.42E+08	41.1	233.12	9.0	1.4	-	-	-	-	-	-
DEHP	391.283	10	149.02	1.56E+08	62.4	167.04	49.5	1.6	71.09	26.2	1.9	279.16	16.8	9.0
DNOP	391.283	10	149.02	2.80E+08	58.8	261.15	12.3	7.4	-	-	-	-	-	-
DINP	419.315	20	71.09	1.15E+08	31.5	149.02	77.6	2.3	85.10	70.8	1.8	293.18	4.7	7.9
DIDP	447.348	20	85.10	3.46E+07	62.1	71.09	74.0	7.4	149.02	40.3	6.0	307.19	4.9	6.1

イオン強度および強度比の平均値およびRSD (%) は 5 回の繰返し測定から算出した。

プロダクトイオンは強度比が 5% 以上のものを最大 3 つまで示した。

表7 PVC製シート(軟質0.1%)におけるプロダクトイオンの強度比およびRSD

PAE	シート タイプ	プリカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	NCE	プロダクトイオン 1			プロダクトイオン 2			プロダクトイオン 3			特徴的なプロダクトイオン		
				<i>m/z</i>	イオン強度比		<i>m/z</i>	イオン強度比		<i>m/z</i>	イオン強度比		<i>m/z</i>	イオン強度比	
					平均値	RSD		平均値	RSD		平均値	RSD		平均値	RSD
DBP	A	279.16	10	149.02	100	-	205.09	10.5	2.8						
DIBP	B		10	149.02	100	-	57.07	14.3	6.6	205.09	5.6	5.9			
DNPenP	A	307.19	10	149.02	100	-	219.10	9.2	2.7						
BBP	B	313.14	10	91.06	100	-	149.02	63.0	2.0	205.09	11.9	1.6			
DCHP	B	331.19	20	167.03	100	-	149.02	78.1	3.4	249.11	22.3	4.0			
DNHexP	A	335.22	10	149.02	100	-	233.12	8.5	3.2						
DEHP	A	391.28	10	149.02	100	-	167.03	49.5	3.8	71.09	26.7	5.0	279.16	15.4	4.4
DNOP	B		10	149.02	100	-	261.15	12.5	3.7						
DINP	A	419.32	20	71.02	100	-	85.10	69.7	1.8	149.02	68.4	2.9	293.18	4.8	9.7
DIDP	B	447.35	20	85.10	100	-	71.09	75.8	2.2	149.02	42.2	3.9	307.19	5.6	11.7

イオン強度比の平均値および RSD の単位は %

プロダクトイオンは強度比が 5% 以上のものを最大 3 つまで示した。

に示した。

## 2) PVC 製シート中の MS/MS スペクトル

PAEs 含有量が 0.1% の PVC 製品でも標準溶液と同様の MS/MS スペクトルが得られることを確認した。0.1% 程度の PAEs を含有する PVC 製品を市場から入手することはできなかつたため、PAEs を含有する PVC 製シートを作製した。PVC 製シートは含有する PAEs の種類が異なる 2 種類 (A タイプ: DBP、DNPenP、DNHexP、DEHP および DINP を含有; B タイプ: DIBP、BBP、DCHP、DNOP および DIDP を含有) を作製した。

PVC 製シートを DART-OT/MS で測定し、各 MS/MS 条件における TIC および MS/MS スペクトルを確認した。PAEs 含有量が 0.1% の軟質 PVC 製シート (Sheet A-S01 および Sheet B-S01) を 5 回測定して得られた各 MS/MS 条件の TIC を図 5 に、0.75 分付近のピーク (3 回目の測定) から得られたそれぞれの MS/MS スペクトルを図 6 に示した。さらに、5 回繰り返し測定したときの各プロダクトイオン強度比の平均値と RSD (%) を表 7 にまとめた。

Sheet A-S01 では DBP および DIBP 用の  $m/z$  279.159、DNPenP 用の  $m/z$  307.189、DNHexP 用の  $m/z$  335.221、DEHP および DNOP 用の  $m/z$  391.283、DINP 用の  $m/z$  419.315 をプリカーサーイオンとしたときに、TIC 上に 5 本のピークが確認された。しかし、BBP 用の  $m/z$  313.143、DCHP 用の  $m/z$  331.189、DIDP 用の  $m/z$  447.348 をプリカーサーイオンとしたときには TIC 上にピークはほとんど確認されなかつた。また、約 0.75 分のピークから得られたそれぞれの MS/MS スペクトルおよびプロダクトイオン強度比は DBP、DNPenP、DNHexP、DEHP および DINP 標準品の MS/MS スペクトル (図 2、表 6) と良く一致した。

同様に Sheet B-S01 では、含有されている

PAEs の TIC 上に 5 本のピークが確認され、展開して得られた MS/MS スペクトルは標準品とよく一致した。一方含有していない PAEs の TIC 上にはピークが検出されない、もしくは検出しても展開して得られた MS/MS スペクトルは標準品と一致しなかつた。

以上の結果から、PVC 製品中に PAEs が含有されていれば、各 MS/MS 条件における TIC 上にピークが検出され、そのピークから得られた MS/MS スペクトルは標準品とほとんど同じであることが明らかとなった。

## 3) スクリーニング法の検証

### ① PVC 製玩具を用いたスクリーニング

PVC 製玩具 25 検体を対象とし、本スクリーニング法による 10 種の PAEs の含有の有無を確認した。測定は一つの試料につき 5 回行い、そのうち最も大きいピークを解析に用いて PAEs の含有の有無を判断した。

DART-OT/MS により 10 種の PAEs のうちいずれかが検出された場合は○、いずれの PAEs も検出されなかつた場合は×とし、それぞれ GC/MS により PAEs 含有量が 0.1% 以上もしくは 0.1% 未満に分類し、表 8 にまとめた。

その結果、DIBP が 17 検体、DBP が 14 検体、DEHP が 7 検体、DINP が 2 検体で「PEAs 検出」と判定され、合計で 40 データの判定結果が「PEAs 検出」となった。このうち GC/MS による PAEs 含有量が規格値の 0.1% 以上であったものが 12 データ、0.1% 未満のものが 28 データあった。一方、「PEAs 不検出」と判定された 210 データについては、GC/MS においてもすべての PEAs 含有量は 0.1% 未満であった。このように、DART-OT/MS を用いたスクリーニングによって、PVC 製品中に規格値以上含有される PAEs を見逃すことなく確実に検出可能であることが示された。



表8 スクリーニング結果のまとめ

PAE	DART-OT/MS: ○			DART-OT/MS: ×		
	GC/MS		Total	GC/MS		Total
	> 0.1	< 0.1		> 0.1	< 0.1	
DBP	3	11	14	0	11	11
DIBP	3	14	17	0	8	8
DNPenP	0	0	0	0	25	25
BBP	0	0	0	0	25	25
DCHP	0	0	0	0	25	25
DNHexP	0	0	0	0	25	25
DEHP	5	2	7	0	18	18
DNOP	0	0	0	0	25	25
DINP	1	1	2	0	23	23
DIDP	0	0	0	0	25	25
Total	12	28	40	0	210	210
試料1検体あたり	9	10	19	0	6	6

## ②規格試験のための検出レベルの設定

DART-OT/MS を用いて、PVC 製品中に規格値以上含有される PAEs を確実に検出可能であることが示された。しかし、DART-OT/MS による測定は GC/MS に比べ高感度であるうえ、クロマトグラフィーによる含有成分の分離を行わないため、GC/MS では定量下限未満とされた PAEs であっても多くが「PAEs 検出」と判定された。そのため、スクリーニング評価に用いた PVC 製玩具 25 検体中 19 検体はいずれかの PAEs を含有すると判定されたが、このうち 10 検体は全ての PAEs 含有量が 0.1% 未満であり、規格試験のスクリーニング法としての効率は、決して良いものではなかった。そこで、PAEs 含有量が 0.1% と判定するための検出レベルを設定し、スクリーニング効率が改善するか確認した。

DBP、DIBP、DEHP および DINP を対象とし、PAEs 含有量が約 0.1% の軟質 PVC 製シート (Sheet A-S01 および Sheet B-S01) を用いて検出レベルを設定した。PVC 製シートから 5 個の切片を取り、各 3 回ずつ計 15 回測定を行

った。一例として、DBP の TIC を図 7 に、各ピークから得られた MS/MS スペクトルのうち、最も高強度のプロダクトイオンの強度を表 9 に示した。スクリーニングにおいて最も重要なことは、規制対象の PAEs が含有している試料を見逃さず、確実に検出することである。そのため検出レベルは、15 回の繰返し測定の中で最も低いプロダクトイオン強度とした。ただし、切片 2 の 3 回目の測定は試料導入がうまくいっていなかったため、極端に低い値であったため除外した中から選択した。

表 10 に新たに設定した検出レベルを用いて再度判定したときの結果をまとめた。その結果、DIBP が 9 検体、DBP が 8 検体、DEHP が 6 検体、DINP は 2 検体で「PAEs 検出」と判定され、合計で 25 データが「PAEs 検出」となった。このうち GC/MS による PAEs の含有量が規格値の 0.1% 以上のものが 12 データ、0.1% 未満のものが 13 データあった。一方、DART-OT/MS で「PAEs 不検出」と判定された 225 データについては GC/MS においてもすべての含有量は 0.1% 未満であった。また、試

表9 PVC 製シートの繰返し測定による閾値の設定

PAEs	Product ion	試験片	回数			検出レベル
			1	2	3	
DBP	Product ion 149.02	1	2.43.E+07	2.86.E+07	3.47.E+07	2.43.E+07
		2	6.44.E+07	1.08.E+08	4.12.E+06	
		3	6.92.E+07	1.20.E+08	3.87.E+07	
		4	1.03.E+08	1.69.E+08	8.22.E+07	
		5	5.72.E+07	8.21.E+07	1.25.E+08	
DIBP	Product ion 149.02	1	2.99.E+07	2.28.E+07	9.57.E+06	7.67.E+06
		2	4.56.E+06	1.02.E+07	3.99.E+07	
		3	7.67.E+06	1.09.E+08	2.22.E+07	
		4	5.72.E+07	1.13.E+08	7.08.E+07	
		5	1.02.E+08	1.90.E+07	5.24.E+07	
DEHP	Product ion 149.02	1	2.61.E+04	3.32.E+05	2.50.E+07	3.80.E+06
		2	1.69.E+07	2.04.E+07	3.80.E+06	
		3	5.31.E+06	2.58.E+07	2.08.E+07	
		4	1.29.E+07	3.94.E+07	7.64.E+06	
		5	3.51.E+04	3.04.E+07	3.48.E+07	
DINP	Product ion 71.09	1	1.15.E+06	3.52.E+05	4.55.E+06	5.39.E+05
		2	2.35.E+06	4.75.E+06	5.54.E+05	
		3	5.60.E+05	2.98.E+06	4.24.E+06	
		4	2.64.E+06	2.28.E+06	3.40.E+06	
		5	5.39.E+05	5.41.E+06	1.15.E+06	

下線は極端に低かったため選択対象から除外

表10 スクリーニング再評価結果のまとめ

PAE	DART-OT/MS: ○			DART-OT/MS: ×		
	GC/MS		Total	GC/MS		Total
	> 0.1	< 0.1		> 0.1	< 0.1	
DBP	3	5	8	0	17	17
DIBP	3	6	9	0	16	16
DNPenP	0	0	0	0	25	25
BBP	0	0	0	0	25	25
DCHP	0	0	0	0	25	25
DNHexP	0	0	0	0	25	25
DEHP	5	1	6	0	19	19
DNOP	0	0	0	0	25	25
DINP	1	1	2	0	23	23
DIDP	0	0	0	0	25	25
Total	12	13	25	0	225	225
試料1検体あたり	9	3	12	0	13	13

料あたりで見れば、25 検体中 12 検体は「PEAs 検出」と判定され、PAEs を規格値以上含有する 9 検体は全てこの中に含まれていた。

このように、検出レベルを設定することにより、PAEs を規格値以上含有する試料に対しては検出レベル設定前と同様の正確性を維持し、規格値未満の試料を「PEAs 検出」と判定してしまう割合を低下させることができ、PAEs の規格試験におけるスクリーニング効率が大きく改善された。

### 3. NMR を用いた PVC 製品中の PAEs の正確な定量法の開発

#### 1) 定量用シグナル、測定溶媒、内標準物質の決定および PAEs 標準品の純度測定

重溶媒としてアセトン- $d_6$  を用いて NMR スペクトルを取得した結果、PAEs のフタル酸の芳香族環 (Ph1 および 2、ただし BBP は Ph3 もある) に由来する二つ (ただし、BBP は三つ) のシグナルは他の可塑剤のシグナルとほとんど重複しなかった (図 8-1 および 2)。そのため、定量用シグナルは Ph1 :  $\delta 7.66$  ppm、Ph2 :  $\delta 7.76$  ppm および Ph3 :  $7.79$  (ただし BBP に限る) を用いることとした。しかし、DPGDB のシグナルがアセトン- $d_6$  では Ph1 のシグナルと重複するためメタノール- $d_4$  を用いることとした (図 9)。また、これらの分離度は十分ではなかったため、BBP 以外の PEAs 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、積分値が小さいシグナルのみを使用した。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。

内標準物質は芳香族環の定量によく用いられるマレイン酸 (MA) の  $\delta 6.4$  ppm のシグナル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、1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- $d_4$  (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。

選択した定量用シグナル、測定溶媒、内標準物質を用いて PAEs 標準品の純度を測定した。その結果、表 1 1 に示すように、純度は 99.8~100.6%であった。

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) 試験溶液調製法

##### ① 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。

試料中の DEHP 濃度が 1% 以上の場合、スキャン回数 32 回で対象シグナルの S/N 比が 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、他に共存する DETHP、DINCH、ATBC、DINA などの影響を受けずに正確に定量可能であった。

## ②アルミナカートリッジカラムを用いた精製法による回収率

試料中の DEHP 濃度が 0.1% の場合、スキャン回数が 256 回でも十分なシグナル積分値が得られなかった。また、試料溶液を 10 倍に濃縮した後に転溶法を適用したが、他の化合物の影響により、回収率が 120% 程度と大きい値となった。

そこで、10 倍に濃縮した後、アルミナカートリッジカラムにチャージし、ヘキサン 10 mL で洗浄後、5% のアセトンを含むヘキサンで通液したところ、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。また、その他の PAEs についても適用したところ、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。また、BBP は 10% のアセトンを含むヘキサンで通液した結果、 $91.2 \pm 0.8\%$  に改善が認められた。

以上の結果から、試料中の PAEs 濃度が 0.1% の場合、アルミナカートリッジカラムを用いた精製法を用いることで、他の可塑剤の影響を受けずに、正確に定量可能であった。

## 3) DART-OT/MS による同定法および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 を用いた可塑剤同定法および PAEs スクリーニング法と NMR を用いた定量法を組み合わせ新たな PAEs 分析法を提案し、その分析の手順を以下に示した。

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。

## 4. PVC 製玩具の使用可塑剤実態調査

### 1) 可塑剤検出率および含有量

市販 PVC 製玩具の可塑剤実態調査を行った結果、DEHTP、ATBC、DINCH など 15 種類の可塑剤が検出された (表 1 2)。いずれもこれまでに PVC 製品から検出されたことがある可塑剤であったが、ASP は PVC 製ゴム手袋において使用されていたことがあるが<sup>25)</sup>、2009 年の調査では検出されなかったことから本研究において初めて PVC 製玩具への使用が確認された。

このうち、DEHTP が最も多く検出され、検出率は 65.9% であった。次いで、ATBC が約 30% (164 検体)、DINCH が約 20% (101 検体)、TMPD および DINA が約 15% から検出された。DBS および DEHP は約 6.5%、TBC および DEHA は約 3% から検出した。その他の可塑剤の検出率は 2% 未満であった。また、可塑剤が全く検出されなかったものが 7 検体あった。

検出頻度が 10% 以上であった DEHTP、ATBC、DINCH、TMPD、DINA のうち DEHTP、DINCH などは平均含有量が 10% 以上であったことから、主可塑剤として使用されるケースが多いと考えられた。一方、ATBC、TMPD などは平均含有量が 10% 以下であったことから、