

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

家庭用品中有害物質の試験法及び基準に関する研究

家庭用品中の防虫剤試験法に関する研究

研究分担者 神奈川県衛生研究所 理化学部 西 以和貴

要旨

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（昭和 48 年 10 月 12 日法律第 102 号、以下「家庭用品規制法」）において、繊維製品に防虫剤として用いられるディルドリン及び 4,6-ジクロル-7-(2,4,5-トリクロルフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール（DTTB）が規制対象となっている。これらの物質に対する試験法は家庭用品規制法施行規則（昭和 49 年 9 月 26 日厚生省令第 34 号）で定められているが、ディルドリンは昭和 53 年、DTTB は昭和 57 年の規制導入当初から試験法が改正されていない。本研究では、これらの試験法を現在の分析技術を用いた効率的な試験法とすべく、測定条件の検討及び精製・抽出条件の予備検討を行った。

現在の DTTB の試験法はガスクロマトグラフ（GC）で測定するために有害なジメチル硫酸を用いていることが問題点として挙げられていたが、今回の検討で Phenyltrimethylammonium Hydroxide（PTAH）を用いたより安全で簡易な誘導体化方法を開発することができた。また、この誘導体化方法はディルドリンの GC における測定を妨害しないため、ディルドリンと DTTB の GC における同時測定が可能であることが明らかとなった。一方で、試料夾雑物の影響によりこれらのピーク面積が増大してしまうマトリックス効果が認められたことから、今後試料夾雑物の効果的な精製方法を検討する必要がある。

さらに、ディルドリン及び DTTB を同時分析するための予備検討として、現在の DTTB 試験法における羊毛の 10%水酸化ナトリウム水溶液による溶解後に、ディルドリン及び DTTB がどのように存在するかを確認した。その結果、これらは溶解後の 10%水酸化ナトリウム水溶液中にはほとんど存在せず、モノフィラメント状になった羊毛に結合または吸着した状態であることが明らかとなった。したがって、このモノフィラメント状になった羊毛に直接抽出溶媒を接触させる方法であれば、効率的にこれらを抽出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（昭和48年10月12日法律第102号、以下「家庭用品規制法」）において、繊維製品に防虫剤として用いられるディルドリン（図1）及び4,6-ジクロロ-7-(2,4,5-トリクロルフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール（DTTB）（図2）が規制対象となっている。これらの物質に対する試験法は家庭用品規制法施行規則（昭和49年9月26日厚生省令第34号）で定められているが、ディルドリンは昭和53年、DTTBは昭和57年の規制導入当初から試験法が改正されていない。試験法制定当時から約30年が経過していることから、現在の分析技術水準から乖離した分析機器や有害な試薬を使用しなければならないことが問題となっている。

現在のディルドリン及びDTTBの試験法の問題点及び改良が期待できる点には次のようなものがあると考えられる。

①パックドカラムの使用

⇒キャピラリーカラムを使用することでピークがシャープになり、それに伴い妨害物質からの分離及び感度の向上が期待できる。

②電子捕獲検出器（ECD）の使用

⇒ECDではプラスチック可塑剤に用いられるクエン酸アセチルトリブチルがディルドリンに近い保持時間に検出され、確認が困難であった事例が報告されている¹⁾。そこで、検出器に質量分析装置（MS）を用いることで、定性的な情報がより多く得られ、確認試験が容易になると考えられる。

③精製におけるカラムクロマトグラフ

⇒現試験法ではカラムを自ら充填して作成しなければならないが、市販のミニカラム等を用いることにより、精製操作が容易になり、試験の再現性も高くなると考えられる。

④発がんのおそれのある試薬の使用

⇒現在の試験法でDTTBの誘導体化に用いられるジメチル硫酸は発がん性があるおそれがあることから、より安全性の高い別の方法を検討すべきと考えられる。

⑤ディルドリンとDTTBが別試験法

⇒鹿庭ら²⁾により同一検体から両物質を抽出する方法が示されていることから、これらを同一の試験法とし、効率化を図ることができると思われる。

以上の点を改善、改良した新規試験法開発を目的とし、本年度はキャピラリーカラム-ガスクロマトグラフ/質量分析装置（GC/MS）を用いた測定条件の検討及び精製・抽出条件の予備検討を行った。

B. 研究方法

B1. 試薬及び使用器具

ディルドリンはDr.Ehrenstorfer社製、DTTBは和光純薬工業製のものをを用いた。これらの純度はいずれも98%以上であった。また、内部標準物質として用いた9-ブロモアントラセン、クリセン-d₁₂は関東化学製の内部標準混合原液3（各100µg/mLジクロロメタン溶液）を購入し用いた。誘導体化試薬である、*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + 1vol% chlorotrimethylsilane (BSTFA +

1%TMCS)、trifluoroacetic anhydride (TFAA)は和光純薬工業製を用いた。同じく誘導体化試薬である phenyltrimethylammonium hydroxide (PTAH) の 0.2 mol/L メタノール溶液はジーエルサイエンス製を用いた。溶媒はピリジンを除きすべて和光純薬工業製の残留農薬・PCB 試験用のものを用いた。ピリジンは和光純薬工業製の特級を用いた。

試料前処理カラムは、Waters 社製の Sep-pak tC18 (充填剤量 400 mg)、Sep-pak vac Florisil (充填剤量 1 g)、及びジーエルサイエンス社の InertSep GC (充填剤量 500 mg)、InertSep NH2 (充填剤量 500 mg) を用いた。

B2. 試料

測定時における試料マトリックスの影響を確認するための試料として、市販の毛糸（紺色）を用いた。また、ディルドリン及び DTTB が含まれる試料として、これらが規制される前（昭和 51 年 7 月）に入手したカーペット（ベージュ）を国立医薬品食品衛生研究所から譲り受け、使用した。

B3. DTTB の誘導体化

BSTFA+1%TMCS については、DTTB 1 μg に対してピリジン 100 μL 、BSTFA+1%TMCS 50 μL を加えた後、GC オープン内で 70 $^{\circ}\text{C}$ 又は 100 $^{\circ}\text{C}$ で 120 分間加温し反応させた後、窒素気流下で乾固したものにヘキサン 1 mL を加えて GC/MS で生成物を確認した。

TFAA については、DTTB 1 μg に対して

ピリジン 100 μL 、TFAA 100 μL を加えた後、GC オープン内で 125 $^{\circ}\text{C}$ 、120 分間加温し反応させた後、窒素気流下で乾固したものにヘキサン 1 mL を加えて GC/MS で生成物を確認した。

PTAH については、DTTB 1 μg にメタノール 1 mL を加え、0.2 mol/L PTAH メタノール溶液を 10 μL 、50 μL 、又は 100 μL 加え、そのまま GC/MS で測定し、生成物を確認した。

B4. 試料中夾雑物の測定への影響の検討

家庭用品規正法施行規則の DTTB 試験法に準じて羊毛の毛糸 0.5 g を 10%水酸化ナトリウム水溶液 (w/v%) 10 mL で 2 時間浸漬して溶解した。ジエチルエーテル 10 mL で 4 回抽出し、これをロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素気流下で乾固し、20 mL のメタノールに溶解したものを夾雑物溶液として用いた。夾雑物による GC/MS 測定への影響の確認は、ディルドリン・DTTB 標準液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液) 1 mL を窒素気流下で乾固した後、夾雑物溶液 1 mL を加え、GC/MS で測定することにより行った。

さらに夾雑物の精製の予備検討として、Sep-pak tC18 (400 mg)、InertSep GC (500 mg)、Sep-pak vac Florisil (1 g)、及び InertSep NH2 (500 mg)による精製効果を確認した。これら 4 つのカートリッジをメタノール 5 mL でコンディショニングした後、夾雑物のメタノール溶液を 3 mL をアプライした。メタノール 10 mL で溶出したあと、窒素気流下で濃縮し、3 mL のメタノール溶液とした。この溶液 1 mL を前述の夾雑物による影響確認と同様に、ディルドリ

ン・DTTB 標準液 (1 µg/mL メタノール溶液) 1 mL を乾固した後に加え、GC/MS で測定し、精製前の結果と比較した。

B5. 抽出条件の予備検討

ディルドリン及び DTTB が含まれるカーペット試料 0.5 g を 50 mL 遠沈管に採り、10% 水酸化ナトリウム水溶液 (w/v%) 20 mL で 2 時間浸漬して溶解した。この溶液を 3000 rpm、15 分遠心分離し、上澄み 10 mL を別の 50 mL 遠沈管に採った。残りの沈殿物を含む液と、上澄み液をそれぞれジエチルエーテル 10 mL で 4 回、ヘキサン 10 mL で 4 回液々抽出を行ったあと、硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ過により除去後、ロータリーエバポレーターで約 1 mL に濃縮し、さらに窒素気流下で乾固した。その後、メタノール 10 mL を加え溶解し、その溶液をメタノールで 10 倍に希釈した。その 1 mL に対し 0.2 mol/L PTAH メタノール溶液 100 µL、1 µg/mL 内部標準物質混合溶液 50 µL を添加し、GC/MS で測定した。

B6. GC/MS 測定条件

測定用試料 1 µL をスプリットレス方式で GC/MS に注入し、SIM 法を用いて定量を行った。内部標準法によりあらかじめ作成した検量線から試料中の各成分の濃度を算出した。

装置 : Agilent Technologies 7980B GC System, 5977B MSD

カラム ① : Agilent Technologies DB-5ms UI (30 m × 0.25 mmID、膜厚 0.25 µm)

カラム ② : Agilent Technologies

DB-17ms (30 m × 0.25 mmID、膜厚 0.15 µm)

注入方式 : スプリットレス、1 µL

注入口温度 : 280°C

カラム温度 : 100°C (1 分) → (20°C / 分) → 280°C (10 分)

キャリアガス : ヘリウム (カラム流量 1.5 mL/分 定流量モード)

イオン源温度 : 300°C

定量イオン : ディルドリン m/z 263

メチル化 DTTB-1 m/z 392

メチル化 DTTB-2 m/z 429

9-プロモアントラセン m/z 256

クリセン-d₁₂ m/z 240

確認イオン : ディルドリン m/z 277

メチル化 DTTB-1 m/z 464

メチル化 DTTB-2 m/z 414

C. 結果及び考察

C1. 誘導体化しない DTTB 測定法の検討

現在の試験法で DTTB の誘導体化に用いられるジメチル硫酸は、発がん性があるおそれがある。したがって、より安全性の高い試験法にするためには、ジメチル硫酸を用いない試験法にするのが望ましい。そこで、まず、誘導体化をしない方法で GC/MS で測定可能かを検討した。

鹿庭らは無極性カラムでは DTTB のピークがテーリングすることを報告している²⁾。一般に、分析対象物質とカラムの極性が合わないとテーリングすることが知られていることから、極性が高いカラムを用いることでテーリングを解消できる可能性があると考えられた。そこで、微極性カラムである DB-5MS と中極性カラムである DB-17MS で DTTB を測定し、そ

のピーク形状を比較したところ、ともにテーリングピークであり、かつ両者のピーク形状に大きな差は認められなかった(図3)。また、DTTBは不活性化の不十分な注入口ライナを用いた場合や、夾雑物溶液(B4参照)を添加した標準溶液を測定した場合ではピークがほとんど検出されなくなるという現象が認められた(図4)。これは、DTTBが注入口ライナのわずかな活性点やライナに付着した夾雑物成分に吸着してしまったため起こったと考えられた。以上のことから、誘導体化せずにDTTBをGC/MSで測定するのは困難であると考えられた。

C2. DTTBの誘導体化法の検討

DTTBの誘導体化については、BSTFA+1%TMCS、TFAAではどの反応条件でも誘導体化生成物を確認できなかった。一方、PTAHを用いるとDTTBのメチル化体(Me-DTTB)のピークが2本確認された(図5)。

PTAHによる誘導体化はGCの注入口において行われるため、注入口温度が240~280°Cの条件でそれぞれMe-DTTBのピーク面積を比較したところ、いずれの条件でもピーク面積に大きな差は認められなかった。したがって、以降は注入口温度を280°Cとして検討を行った。

続いて、PTAHの添加量を検討するために、DTTB標準液(1 µg/mLメタノール溶液)1 mLに対し、0.2 mol/L PTAHメタノール溶液の添加量を10 µL、50 µL、100 µLと変化させて未変化のDTTBのピークを確認した。その結果、未反応のDTTBは添加量10 µLの時は微量のピークが検出

されたが、50 µL・100 µLではほとんど検出されなかった(図6)。さらに、DTTB 1 µgに対し、夾雑物溶液(B4参照)を1 mL、0.2 mol/L PTAHメタノール溶液を100 µL添加したところ、マトリックス効果によりMe-DTTBのピーク面積は増大したものの、減少は認められなかったことから、0.2 mol/L PTAHメタノール溶液の添加量は100 µLで不足はないと考えられた。PTAHによる誘導体化は試験溶液に試薬を添加し、GC/MSに導入するのみで完了することから、安全かつ簡易な誘導体化法であると言える。したがって以降の検討では、DTTBの誘導体化試薬としてPTAHを採用し、標準液1 mLに対する0.2 mol/L PTAHメタノール溶液の添加量を100 µLとして検討を行った。

C3. デイルドリン及びDTTBの同時測定法の検討

現在の試験法では、デイルドリン及びDTTBは別の試験法が定められている。デイルドリン及びDTTBは羊毛製品の防虫加工という同じ目的で使用されていたものであることから、これらを同時に分析できる分析法を開発することで、より効率的な試験が可能となると期待される。そこで、デイルドリンの標準液に対し、前項と同様の条件でPTAHを添加し、GC/MSで測定したところ、デイルドリンの分解物等は確認されず、保持時間もMe-DTTBと異なることから、互いに干渉しない良好なクロマトグラムが得られた(図7)。また、デイルドリン・DTTBの同時測定における検量線について、「水道水質検査の妥当性評価ガイドライン」³⁾

に準じて評価を行った。その結果、1~50 ng/mL 及び 10~250 ng/mL において各濃度点の真度が 80~120%、相対標準偏差が 20%以内というガイドラインの目標を満たす良好なものであった(表 1・2、図 8・9)。また、定量下限値は、Agilent MassHunter の Replicate Injection MDL-LOQ-LOD calculation で 1 ng/mL の 5 回繰り返し測定の結果を用いて算出したところ、ディルドリンは 0.83 ng/mL、DTTB (Me-DTTB-1) は 1.2 ng/mL であった。したがって、GC/MS によりこれらの同時分析が高感度かつ高精度で可能であることが示唆された。なお、Me-DTTB-2 より Me-DTTB-1 の方が測定感度が良いことから、定量には Me-DTTB-1 の測定結果を用いるのがよいと考えられた。

一方で、ディルドリン及び DTTB のピーク面積が夾雑物の影響により増大するマトリックス効果が認められた(図 10)。そこで、この夾雑物溶液をオクタデシル化シリカゲル (C18)、グラファイトカーボン (GCA)、フロリジル (FL)、アミノプロピル化シリカゲル (NH2) カートリッジで精製した後、ディルドリン及び DTTB のピークの増大幅を確認したところ、ほとんどの場合で増大幅の減少が確認できた。したがって、試料夾雑物によるマトリックス効果への対処には精製が有効であることが示唆された。

C4. 試料抽出法の予備検討

現在の試験法では、ディルドリン及び DTTB はそれぞれ別の抽出法で抽出されている。試験法を統合するためには、同じ方法でこれらを抽出できる抽出方法を

検討する必要がある。鹿庭らは、現在の DTTB 試験法でのジエチルエーテル 10 mL での 4 回による液々抽出に加え、さらにヘキサン 10 mL で 4 回液々抽出を行うことで、ディルドリンも十分に抽出されることを報告している²⁾。しかしながら、この方法は合計 8 回の液々抽出を行うことから非常に時間・手間がかかることは否めない。そこで、より効率的な抽出法を開発すべく、その予備検討を行った。

前述の鹿庭らの報告において、ディルドリンは標準溶液からはジエチルエーテル、ベンゼン、ヘキサンの十分に抽出されるが、実際の防虫加工と同様に加工した布からはヘキサンでしか十分に抽出されなかったことを報告している²⁾。この結果から、10%水酸化ナトリウムによって羊毛がモノフィラメント状になった後も、ディルドリンは繊維に結合または吸着された状態であると予想された。そこで、ディルドリン及び DTTB で加工されたカーペットについて、10%水酸化ナトリウム 20 mL で溶解後、遠心分離を行い、得られた上澄み 10 mL と残渣を含む溶液 10 mL をそれぞれジエチルエーテル及びヘキサンで抽出を行い、含まれるディルドリン及び DTTB の濃度を比較した。その結果、ディルドリン及び DTTB は上澄み溶液の抽出液からはほとんど検出されず、残渣を含む溶液からの抽出物から検出された(図 11)。したがって、ディルドリン及び DTTB はほとんどがモノフィラメント状になった繊維に結合または吸着された状態で存在していることが明らかとなった。すなわち、前述の鹿庭らの方法は、液々抽出の振とうの際にわずかにモノフ

フィラメントに接触する有機溶媒により抽出が行われており、抽出法としては非効率的である可能性が考えられた。したがって、直接的にモノフィラメントに抽出溶媒を接触させる方法であれば、効率的にディルドリン及び DTTB が抽出できると考えられた。

D. まとめ

ディルドリン及び DTTB の試験法は現在の分析技術水準から乖離した方法であることが問題視されている。本研究では、現在の試験法の問題点及び改良が期待できる点を洗い出し、それらを改良した新規試験法を開発するための予備的な検討を行った。

現在の DTTB の試験法では GC で測定するために有害なジメチル硫酸を用いていることが問題点として挙げられていたが、今回の検討で Phenyltrimethylammonium Hydroxide (PTAH) を用いたより安全で簡易な誘導体化方法を開発することができた。この誘導体化方法はディルドリンの GC/MS における測定を妨害しないため、ディルドリンと DTTB の GC/MS における同時測定が可能であることが明らかとなった。一方で、試料夾雑物の影響によりこれらのピーク面積が増大してしまうマトリックス効果が認められたことから、今後試料夾雑物の効果的な精製方法を検討する必要がある。

さらに、ディルドリン及び DTTB を同時分析するための予備検討として、現在の DTTB 試験法における羊毛の 10%水酸化ナトリウムによる溶解後に、ディルド

リン及び DTTB がどのように存在するかを確認した。その結果、これらは溶解後の 10%水酸化ナトリウムにはほとんど存在せず、モノフィラメント状になった羊毛に結合または吸着した状態であることが明らかとなった。したがって、このモノフィラメント状になった羊毛に直接抽出溶媒を接触させる方法であれば、効率的にこれらを抽出できる可能性が示唆された。

E. 研究発表

E1. 論文発表

なし

E2. 学会発表

- 1) 西以和貴: 繊維製品中の防虫剤試験法改定に向けた試みについて, 平成 29 年度神奈川県内衛生研究所等連絡協議会理化学情報部会, 2018 年 3 月

F. 知的所有権の取得状況

4. 特許取得
なし
5. 実用新案登録
なし
6. その他
なし

G. 引用文献

- 1) 田邊英子・肥塚加奈江・山本淳・北村雅美・山辺真一・今中雅章: 有害物質を含有する家庭用品の検査における疑義事例, 岡山県環境保健センター年報, 31, 143-147, 2007

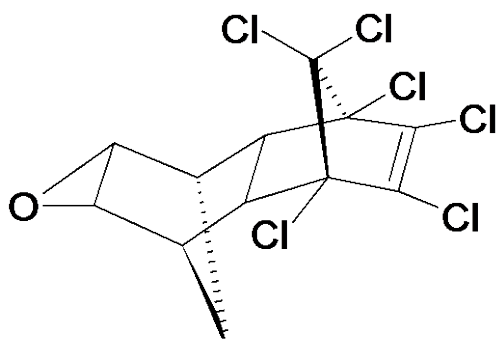
- 2) 鹿庭正昭・小嶋茂雄・中村晃忠・佐藤洋子: 羊毛防虫加工剤の系統別分析法, 衛生化学, 25, 80-95, 1979
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課. 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン, 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1 号 別添
- 4) SRC, Inc.: FatePointers Search Module
<http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>
(2018.3.8 閲覧)
- 5) U.S.EPA: Chemistry Dashboard
<https://comptox.epa.gov/dashboard>
(2018.3.8 閲覧)

表1 デイルドリン及び DTTB の検量線 (10~250 ng/mL) における各濃度点の真度及び相対標準偏差 (n=5)

検量線濃度点(ng/mL)		10	20	50	100	250
デイルドリン	真度(%)	97.9	97.9	99.5	101	99.8
	RSD(%)	2.51	1.78	0.456	0.503	2.98
Me-DTTB-1	真度(%)	99.8	103	98.4	100	100
	RSD(%)	3.39	8.55	3.34	5.38	6.65
Me-DTTB-2	真度(%)	98.7	101	99.6	100	100
	RSD(%)	10.5	7.11	3.29	5.82	6.10

表2 デイルドリン及び DTTB の検量線 (1~50 ng/mL) における各濃度点の真度及び相対標準偏差(n=5) (Me-DTTB-2 は感度不足のため除外)

検量線濃度点(ng/mL)		1	2	5	10	20	50
デイルドリン	真度(%)	93.2	97.1	99.1	102	99.9	99.9
	RSD(%)	7.96	5.51	1.57	2.39	1.74	0.452
Me-DTTB-1	真度(%)	92.6	101	104	101	103	98.3
	RSD(%)	11.6	8.40	6.11	3.35	8.49	3.33



Cas No.: 60-57-1
Molecular Weight: 380.912
Boiling Point: 330°C
LogPow: 5.4

図1 ディルドリンの構造式及び物性値等⁴⁾

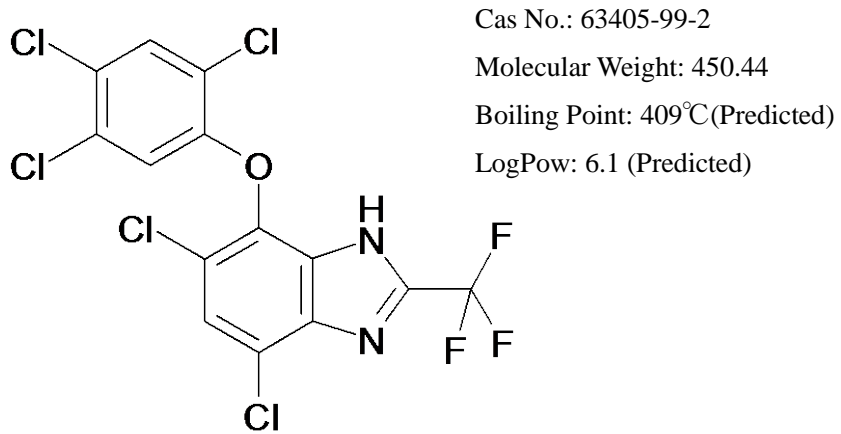


図2 DTTBの構造式及び物性値等⁵⁾

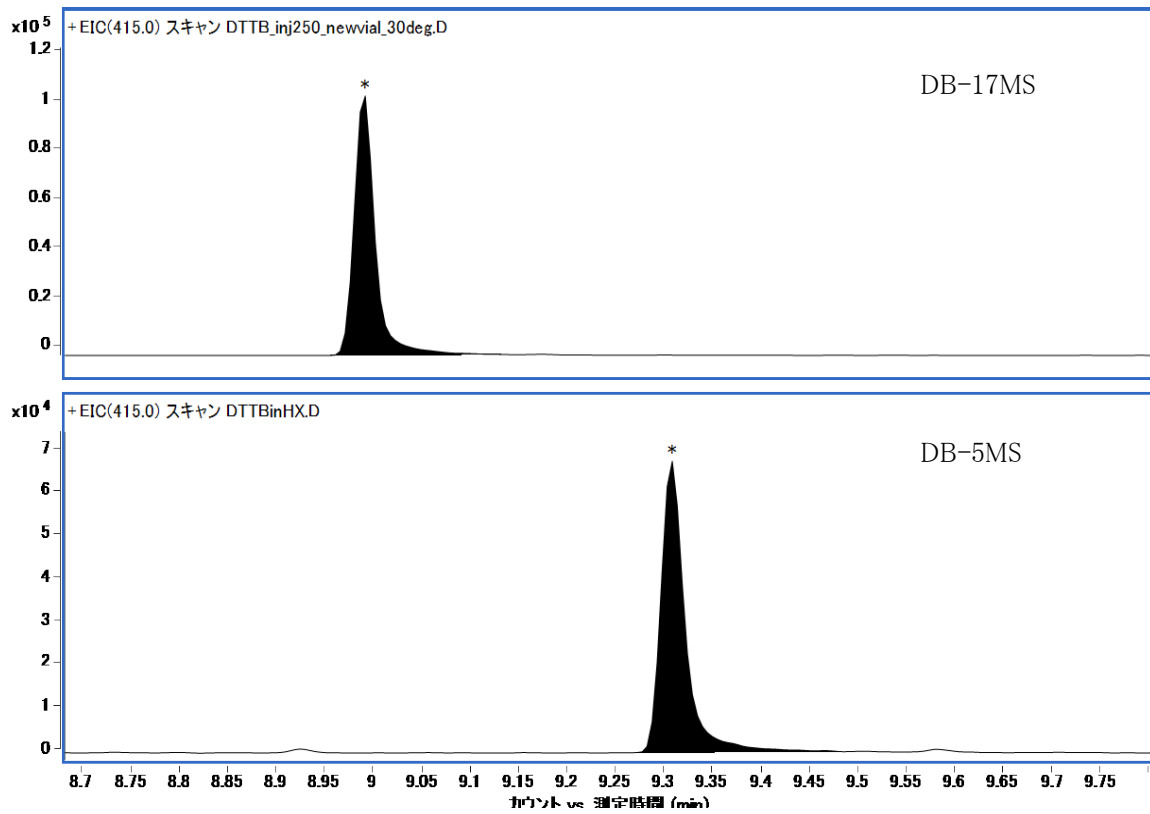


図3 極性の異なるカラムによる DTTB のピーク形状の違い

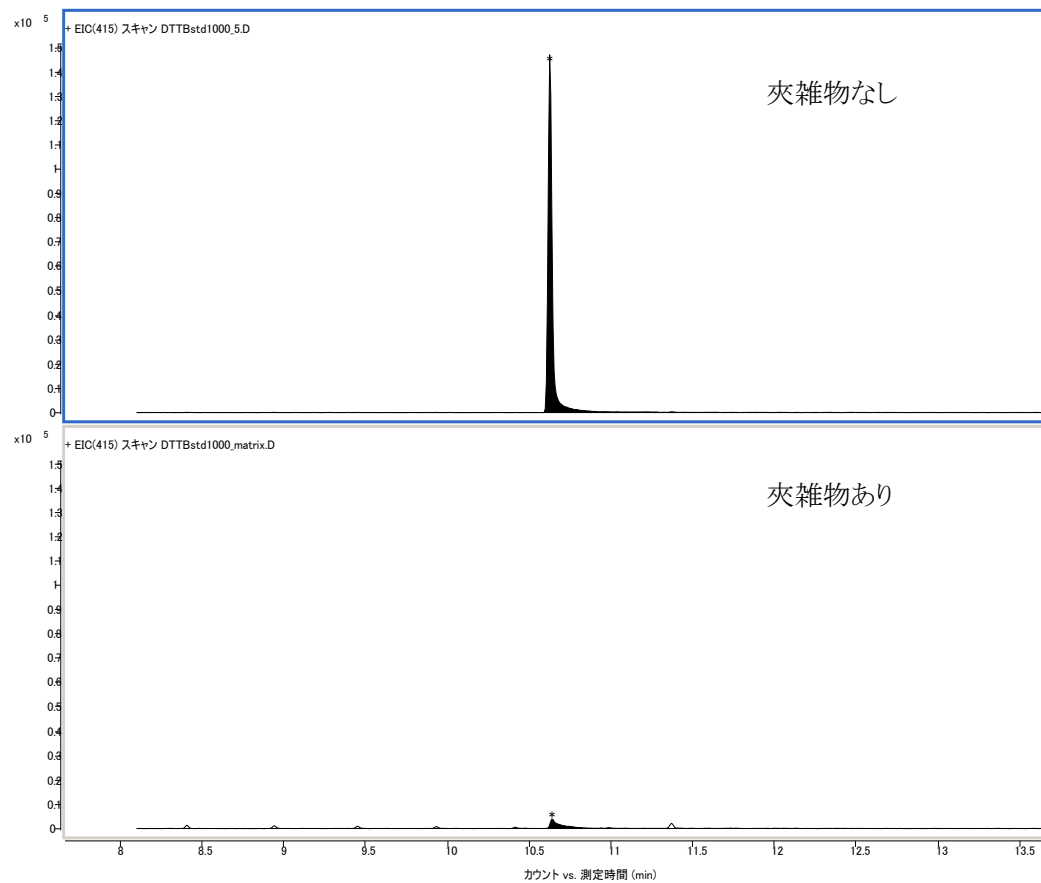


図 4 誘導体化せずに DTTB を GC/MS 測定した場合の試料夾雑物の影響
 (1000 ng/mL をスキャン測定し、DTTB の代表的なフラグメントの質量数 m/z 415 で抽出したクロマトグラム)

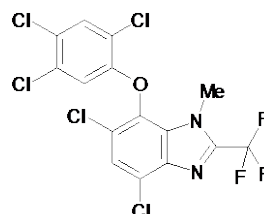
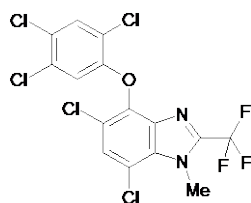
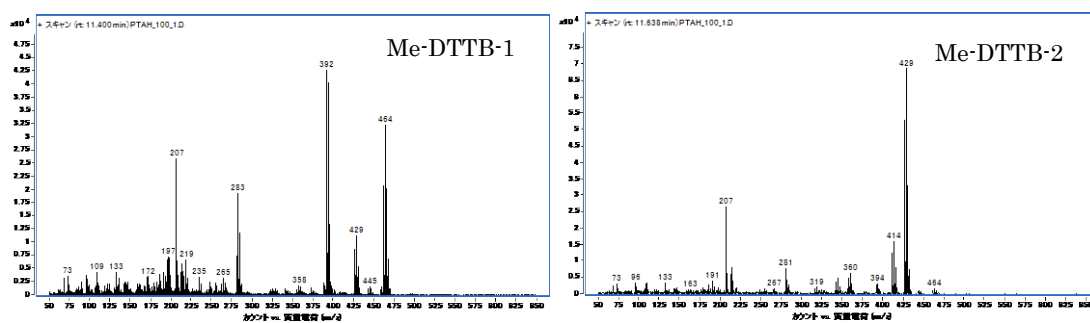
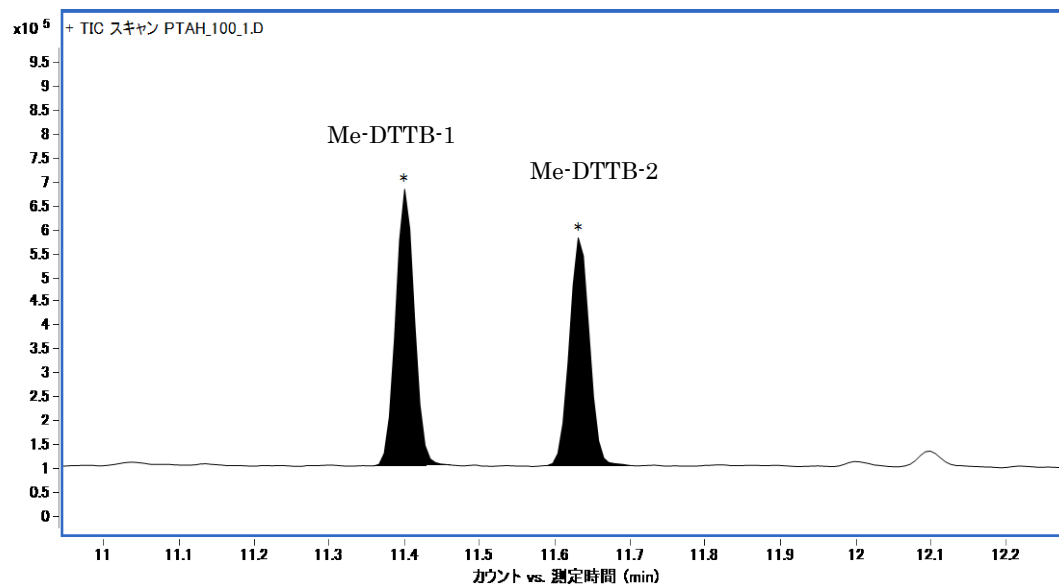


図5 PTAHによるDTTBのメチル誘導体化生成物のクロマトグラム、マススペクトラム及び構造式(構造式は鹿庭ら²⁾の報告を基に推定した)

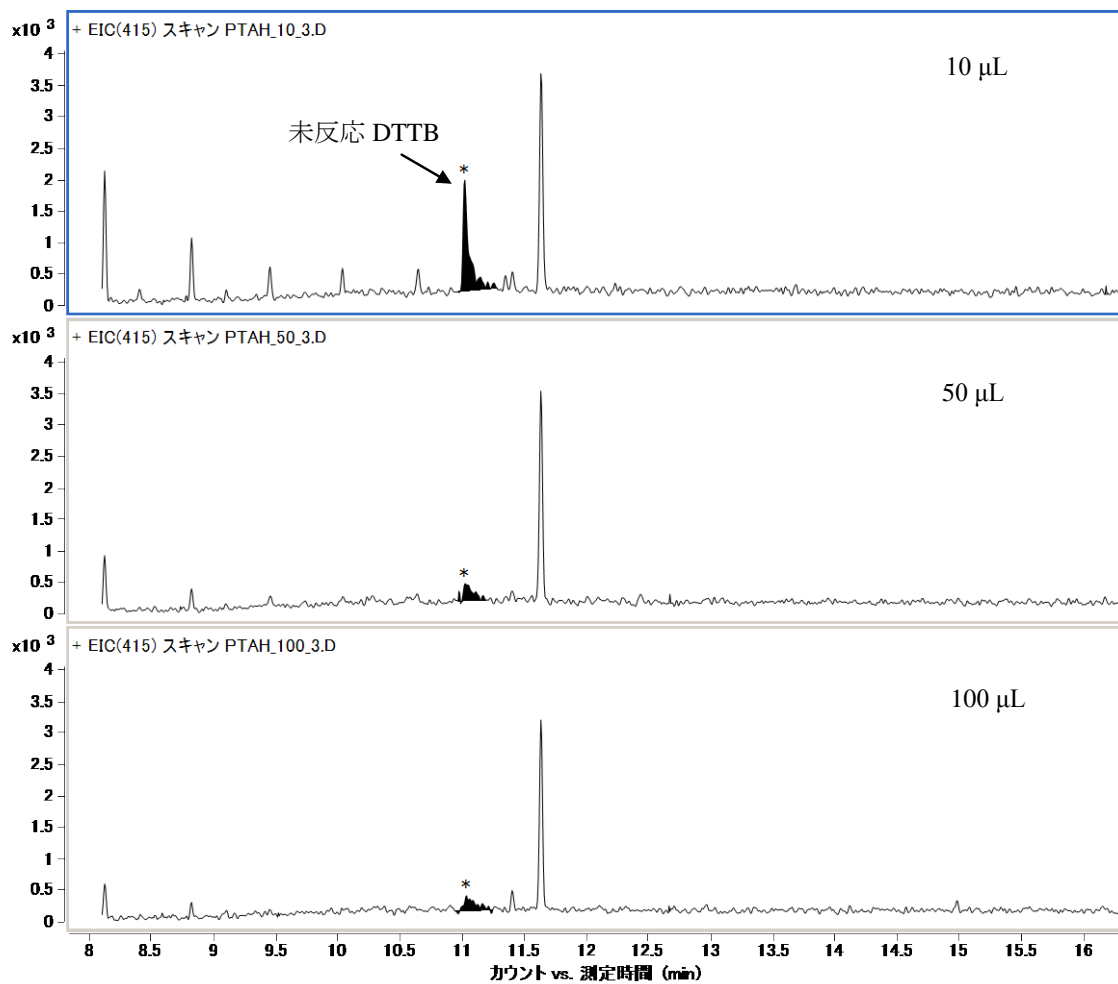


図 6 0.2 mol/L PTAAH メタノール溶液の添加量の変化に伴う未反応 DTTB の残存量の変化
(SCAN 測定したものから m/z 415 を抽出したクロマトグラム)

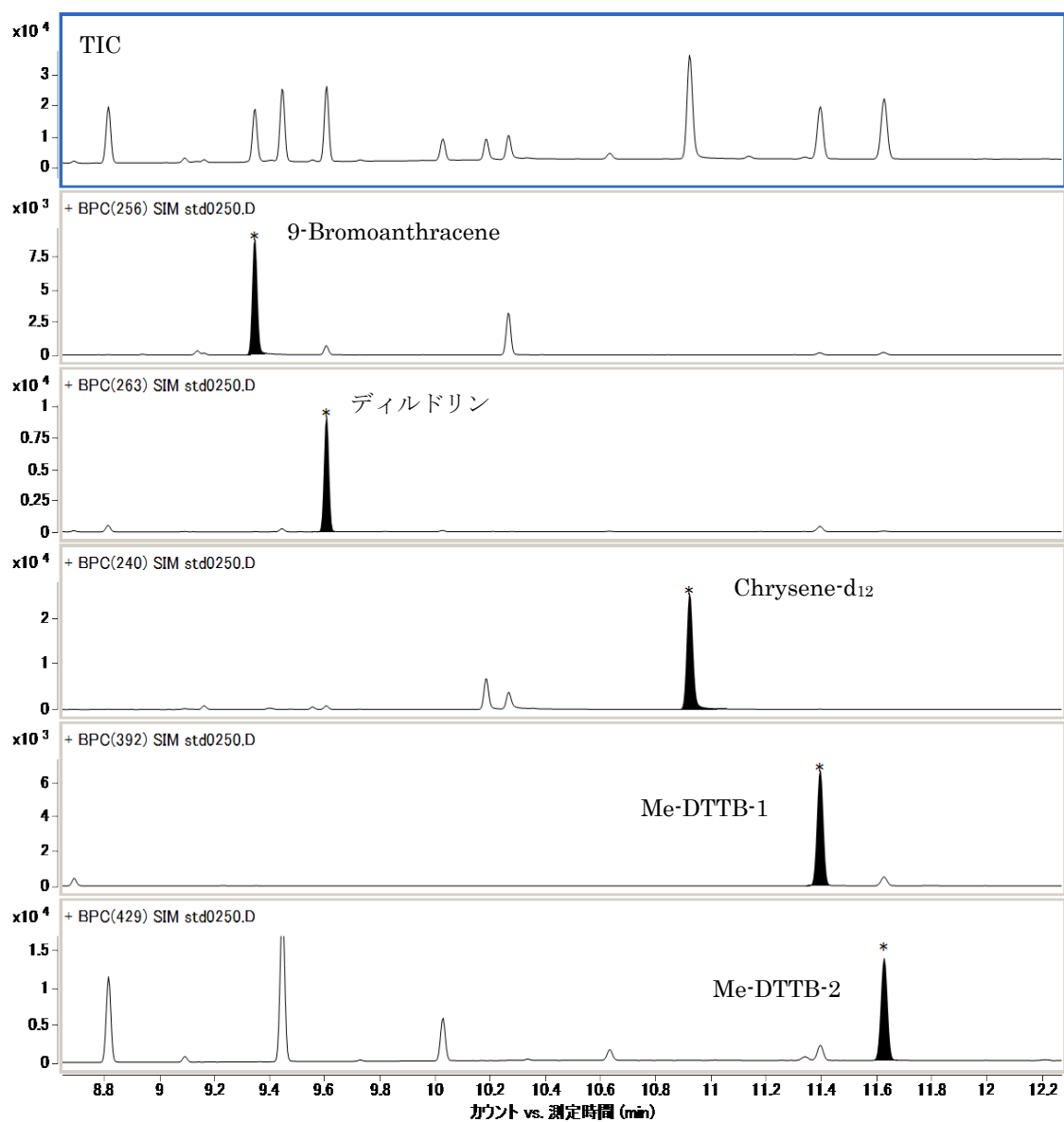
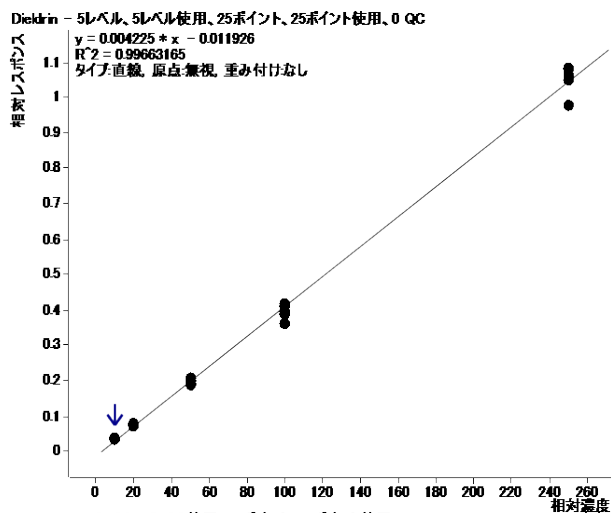
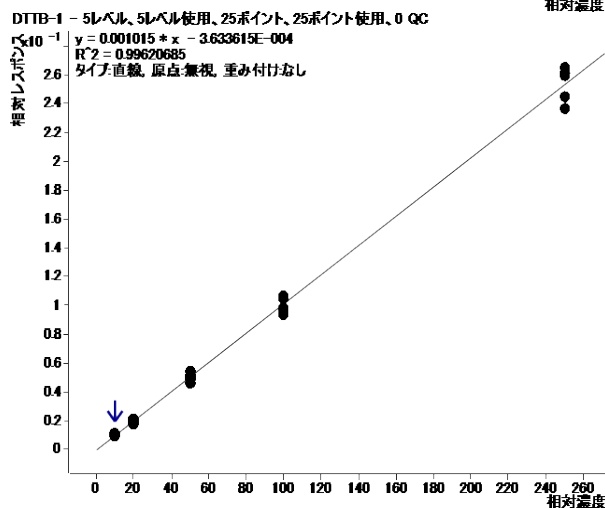


図7 Me-DTTB、ディルドリン、及び内部標準物質(9-Bromoanthracene、Chrysene-d₁₂)の SIMクロマトグラム

ディルドリン



Me-DTTB-1



Me-DTTB-2

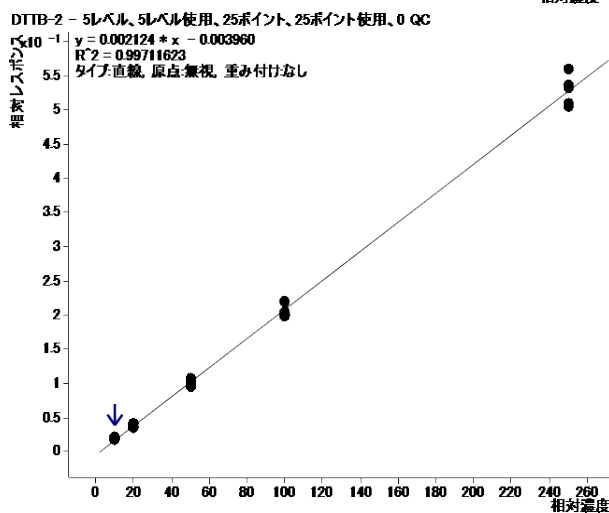
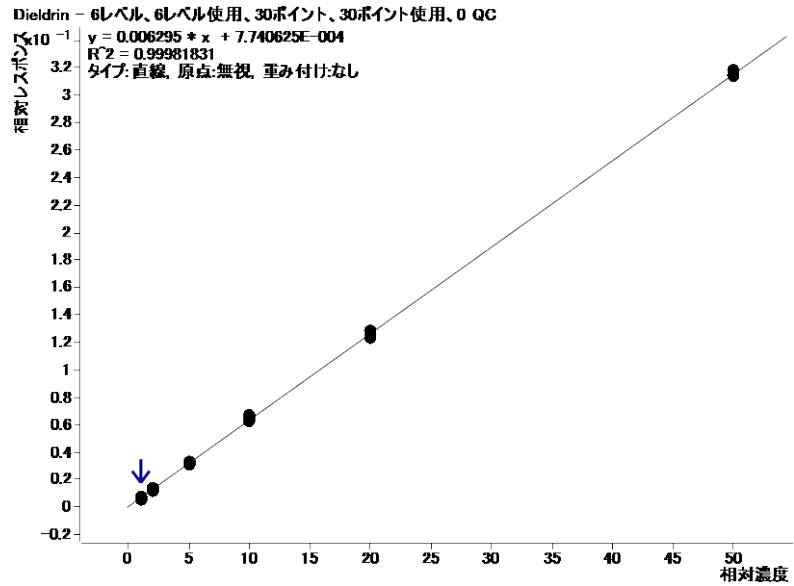


図 8 ディルドリン(内部標準物質 9-Bromoanthracene)、及び Me-DTTB (内部標準物質 Chrysene-d₁₂)の検量線(濃度 10~250 ng/mL、各点 n=5)

ディルドリン



Me-DTTB-1

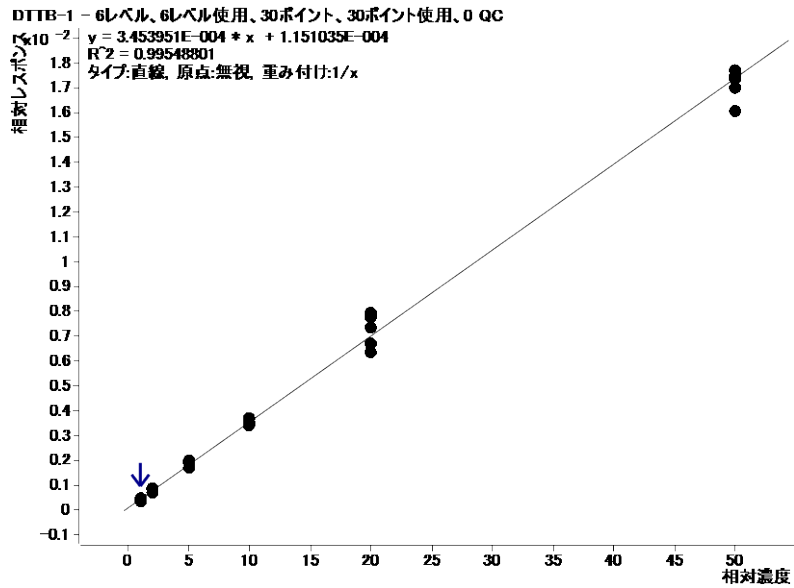


図 9 ディルドリン(内部標準物質 9-Bromoanthracene)、及び Me-DTTB (内部標準物質 Chrysene-d₁₂)の検量線(濃度 1~50 ng/mL、各点 n=5) (Me-DTTB-2 は感度不足のため省略)

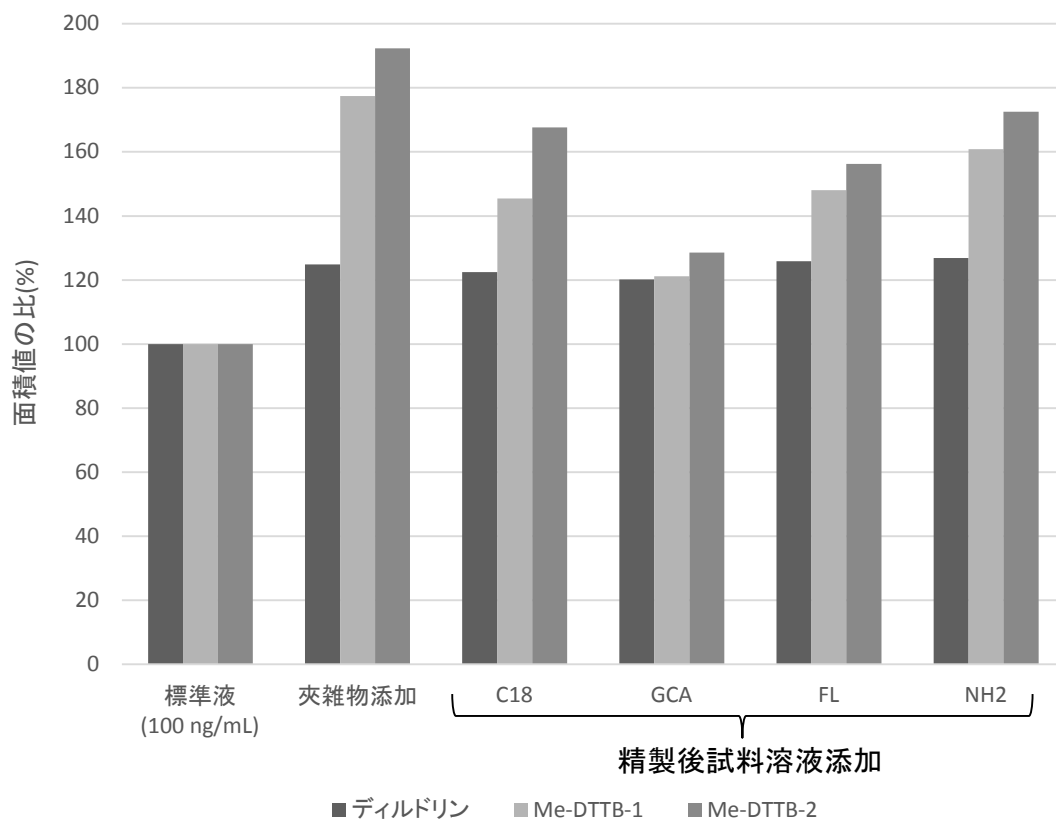


図 10 夾雑物添加によるピーク面積の増大及び夾雑物精製による増大幅の変化

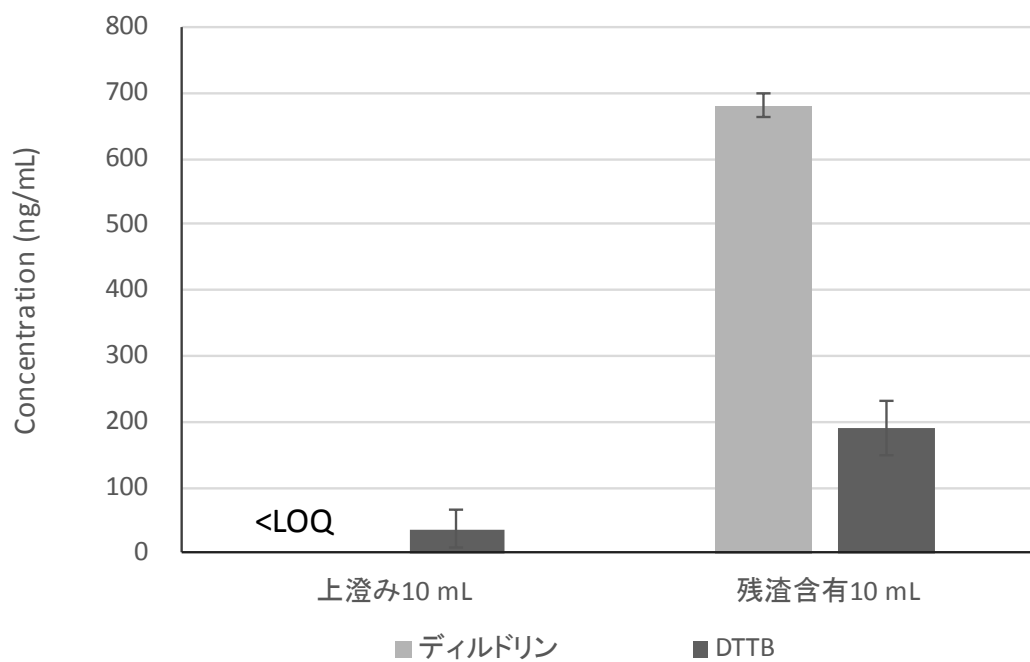


図 11 10%水酸化ナトリウム水溶液 20 mL で溶解した羊毛製品(カーペット)におけるディルドリン及び DDTB の分布(各 n=3)

※定量下限値(LOQ): 共に 10 ng/mL