

厚生労働科学研究費補助金（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、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改正されていない。これらの試験法は有害な試薬の使用や、現在の分析水準と乖離した測定機器の使用、これら 2 物質の試験法が別々に規定されている非効率性などの問題がある。本研究では、これらの諸問題を解決し、安全かつ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毒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る。そこで昨年度の検討では、Phenyltrimethylammonium Hydroxide（PTAH）を用いることで、より安全で簡易に DTTB を誘導体化できることを明らかにした。しかしながら、今年度の検討で、PTAH と試料マトリックスの存在下でディルドリンのレスポンスが低下する現象が認められた。そこで、試験法の堅牢性確保のため、試験溶液は DTTB 試験用とディルドリン試験用に分けて測定することとした。次に、妨害物質による GC/MS への負荷等の低減のため、市販ミニカラムを用いた試料抽出液の精製を検討した。その結果、試料抽出液を液々分配でヘキサン転溶した後、Bond Elut PRS で精製することによって、妨害物質を大幅に除去し、かつ両物質をほぼ損失することなく試料抽出液を精製する方法が確立できた。また、ディルドリン・DTTB 同時抽出法について検討した結果、塩酸メタノールによる還流抽出により、現試験法と同等の抽出が可能であった。

以上の結果を踏まえ、新たに試験法を考案し、その性能を評価したところ、ディルドリン・DTTB の両物質で、回収率が 94%以上 104%未満、RSD が 7%未満と、良好な結果を得ることができた。また、定量下限値は現行の基準値である 30 µg/g を大きく下回っており、試験法としての必要条件を満たしていると考えられた。今年度の検討で、現行法よりも効率性、安全性が優れた試験法が開発できた。

C. 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）（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の使用、これら 2 物質に別々の試験法が規定されている非効率性などが問題となっている。

昨年度は DTTB の現試験法に用いられている有害なジメチル硫酸の役割を代替できる試薬の探索を行い、より操作が簡便で安全な試薬である Phenyltrimethylammonium Hydroxide (PTAH) の有効性を明らかにした。また、ディルドリン及び DTTB の現試験法で分析機器がパックドカラム-ガスクロマトグラフ/電子捕獲検出器 (ECD) であったところを、より定性能力の高いキャピラリーカラム GC/質量分析装置 (MS) とすることが可能であることが示唆された。

GC/MS で分析する上で、機器への負荷やマトリックス効果によるレス

ポンス異常を低減するために、試料の精製は必須である。現在の試験法では、ディルドリン試験法ではフロリジルを用いたカラムクロマトグラフィーが、DTTB 試験法では誘導体化後の液々抽出が精製の役割を担っていると考えられる。これらは操作が煩雑または精製が不十分で測定に悪影響を与えるおそれがあることから、新たな精製法を検討する必要があると考えられた。

また、ディルドリン及び DTTB は羊毛の防虫加工という同じ目的で使用されることから、これらを同時抽出できる方法があればより効率的な試験法ができると期待される。

そこで本年度は、より効率的な試験法の開発を目的に、精製法及び抽出法の検討を行った上で新たな試験法を考案し、その性能を評価した。

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フルオランテン-d₁₀ は C/D/N isotope 社、クリセン-d₁₂ は関東化学製を用いた。内部標準溶液として、フルオランテン-d₁₀、クリセン-d₁₂ の 1 µg/mL 酢酸エチル溶液を調製した。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ューエルサイエンス製を用いた。塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム・12 水

和物、クエン酸（無水）は富士フィルム和光純薬製の特級を用いた。また、塩酸は富士フィルム和光純薬製のアミノ酸自動分析用を用い、その他溶媒はすべて富士フィルム和光純薬製の残留農薬・PCB 試験用のものを用いた。

試料前処理カラムは、Waters 社製の Sep-pak silica (充填剤量 690 mg)、Sep-pak vac Florisil (同 1 g)、ジーエルサイエンス社製の InertSep SAX (同 1 g)、InertSep NH2 (同 1 g)、InertSep PSA (同 1 g)、及びアジレント・テクノロジー社製の Bond Elut PRS (同 1 g)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、及び添加回収試験の試料として、市販の毛糸（100%ウール）及び毛糸（50%アルパカ）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に購入したカーペット（ベージュ）（昭和 51 年 7 月入手）を使用した。

B3. 夾雑物による影響確認用試料（夾雑物溶液）の調製

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。

B4. PTAH によるディルドリン分析への

影響検討

標準溶液（各 30 ng/mL）を用い、GC/MS での測定前に PTAH 溶液及び B3 の夾雑物溶液を添加した場合と添加しない場合でレスポンスを比較した。

B5. 精製法の検討（ミニカラムの選択）

Sep-pak silica (690 mg)、Sep-pak vac Florisil (1 g)、InertSep SAX (1 g)、InertSep NH2 (1 g)、InertSep PSA (1 g)、Bond Elut PRS (1 g)を用い、次に述べる方法で回収率を求めた。各ミニカラムをアセトン 5 mL、ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後、ディルドリン・DTTB 混合標準液（1 µg/mL ヘキサン溶液）1 mL を負荷し、ヘキサン 4 mL で洗浄した。その後、ミニカラムに窒素を通気してヘキサンの大部分を除去し、酢酸エチル/メタノール（1/1 v/v）5 mL で溶出して、同溶媒で 10 mL とし、得られた溶液中のディルドリン・DTTB 濃度を測定した。

B6. 精製法の回収率及び効果の検証

B3 の夾雑物溶液 20 mL にディルドリン・DTTB を各 10 µg 添加後、窒素気流下で約 2 mL に濃縮した。これにリン酸クエン酸緩衝液水溶液（pH2）10 mL 及びヘキサン 10 mL を加え、10 分間振とう後 10 分間 3000 rpm で遠心処理をした。その後のヘキサン相 1 mL を Bond Elut PRS に負荷し、B5 に示した手順で精製した後、GC/MS で測定した。

B7. ディルドリン及び DTTB の同時抽出法検討

過去にディルドリン及び DTTB が検出

された試料 0.5 g にメタノール 50 mL を加えたのち、濃塩酸を 100 μ L、500 μ L、1000 μ L 加えて 70°C で 30 分間還流抽出を行い、ディルドリン及び DTTB の濃度を確認した。また、現行のディルドリン試験法及び DTTB 試験法と新抽出法の抽出率の比較を行った。

さらに、濃塩酸を 100 μ L 加えて抽出した試料の残渣を鹿庭ら (1979) の方法に従って再抽出し、ディルドリン及び DTTB の濃度を確認した。すなわち、残渣を 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後、ジエチルエーテル 10 mL で 4 回、さらにヘキサン 10 mL で 4 回液々抽出を行い、ディルドリン及び DTTB の濃度を測定した。

抽出後の試験溶液について、測定時のマトリックス効果を低減するため、B6 で示した方法を一部変更し、次の精製を行った。抽出液をロータリーエバポレーター及び窒素気流を用いて濃縮後、10 mL メタノール溶液とした。その 2 mL を 50 mL 遠沈管にとり、これに 10% 塩化ナトリウム水溶液を 10 mL 加え、抽出時に塩酸を加えていない試料には塩酸を 20 μ L 加えた。これにヘキサン 4 mL を加え、10 分間振とう後、10 分間 3000 rpm で遠心処理した後、ヘキサン相 1 mL を採り、予めコンディショニングした Bond Elut PRS に負荷した。Bond Elut PRS のコンディショニングはアセトン 5 mL、ヘキサン 10 mL によって行った。試料負荷後の固相をヘキサン 4 mL で洗浄し、窒素を 10 分間通気して固相内のヘキサンの大部分を除去した。溶出は酢酸エチル/メタノール(1/1 v/v) 5 mL で行い、同溶媒で正確に 5 mL とした。

この 1 mL に内部標準溶液 (フルオランテン-d₁₀、クリセン-d₁₂ 各 1 μ g/mL 酢酸エチル溶液) を 50 μ L、PTAH 溶液 (0.2 M メタノール溶液) を 100 μ L 加えた後、DTTB 濃度を測定した。ディルドリンは内部標準溶液のみを上記同様に加え、PTAH 溶液を加えずに濃度を測定した。

B8. 開発した試験法の性能評価

上記検討を踏まえ、図 3 に示した試験法を開発し、次に示す試料を用いてその性能を評価した。

評価用の試料は、市販の毛糸 (100% ウール) 及び毛糸 (50% アルパカ) にディルドリン・DTTB 混合標準液 10 μ g/mL または 100 μ g/mL メタノール溶液を 100 μ L 添加し、一晚室温で放置して調製した。毛糸中の濃度はそれぞれ 2 μ g/g、20 μ g/g であった。

定量下限値は 2 μ g/g の試験 (n=6) の結果の 10 σ により算出した。

B9. GC/MS 測定条件

測定用試料 1 μ L をパルスド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 : Agilent Technologies DB-5ms UI (30 m \times 0.25 mmID、膜厚 0.25 μ m)

注入方式 : パルスドスプリットレス、1 μ L、注入パルス圧 10 psi 1 分間
注入口温度 : 240°C

カラム温度：100℃(1分)→(10℃/分)→
240℃ →(5℃/分) →280℃(7分)
キャリアガス：ヘリウム（カラム流量
0.6 mL/分 定流量モード）
イオン源温度：300℃
定量イオン： デイルドリン m/z 263
メチル化 DTTB-1 m/z 392
メチル化 DTTB-2 m/z 429
フルオランテン-d₁₀ m/z 212
クリセン-d₁₂ m/z 240
確認イオン： デイルドリン 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. PTAH によるデイルドリン分析への影響検討

昨年度デイルドリンの内部標準物質として、9-ブロモアントラセンを用いていたが、試料マトリックスと PTAH の共存下で大幅にレスポンスが低下する現象が認められた。

そこで、デイルドリンに対しても同様の事象がないか検討した。その結果、デイルドリンも同様に試料マトリックスと PTAH の共存下でレスポンスが低下する現象が認められた（表1）。

昨年度も同様の実験を行った際には、デイルドリンのレスポンスはむしろ増加していた。詳細は不明であるが、GC/MS のコンディション等によって、この現象の有無や程度が変わるといった可能性が考えられた。

デイルドリン及び DTTB が GC/MS で同時に測定できるのが効率的で望ましい。しかしながら、試験法の堅牢性の観点か

ら、DTTB を測定する試験溶液とは別に、PTAH 溶液を加えないデイルドリン測定用の試験溶液を取り分けることとした。これにより増える操作は、試料の抽出・精製後の試験溶液を DTTB 測定用とデイルドリン測定用に取り分けるのみである。最終的に試料の同時精製・抽出法が確立できれば、この取り分け操作が試験法の効率性に及ぼす影響は小さいと考えられた。

C2. 精製法の検討（ミニカラムの選択）

妨害物質による GC/MS への負荷及びマトリックス効果の低減には試料抽出液の精製が必要である。現在の試験法では、デイルドリン試験法ではフロリジルを用いたカラムクロマトグラフィーが、DTTB 試験法では誘導体化後の液々抽出が精製の役割を担っていると考えられる。これらは操作が煩雑もしくは精製が不十分で測定に悪影響を与えるおそれがあることから、市販のミニカラムを用いた簡易かつ溶媒使用量の少ない精製方法を検討した。

まず、精製に用いるミニカラムの種類を選択するため、Sep-pak silica (690 mg)、Sep-pak vac Florisil (1 g)、InertSep SAX (1 g)、InertSep NH2 (1 g)、InertSep PSA (1 g)、Bond Elut PRS (1 g)を用い、回収率を求めた。その結果、Sep-pak silica と Bond Elut PRS の回収率が良好であった（表2）。Bond Elut PRS はシリカゲルベースの陽イオン交換作用を持ったカラムであることから、Sep-pak silica よりも高い精製効果が得られることを期待し、以降の検討は Bond Elut PRS を用いて行っ

た。

C3. 精製法の回収率及び効果の検証

C2に示した精製する際には、負荷時の溶媒をヘキサンにする必要がある。しかし、試料抽出後、乾固してヘキサンに再溶解する方法では、DTTBが十分に溶解しない現象が認められた。これはヘキサン不溶性のマトリックスにDTTBがとりこまれたためと考えられたことから、液々分配によりヘキサンに転溶する方法を用いた。この液々分配及びBond Elut PRSによる精製により、妨害ピークを大幅に減少させることができた(図4)。さらに、この精製法の回収率(n=3)はディルドリンが95.8%(RSD1.3%)、DTTBが107%(RSD3.2%)と良好な結果が得られた。本検討により、ディルドリン及びDTTBをほぼ損失することなく、かつ効果的に抽出液を精製する方法が確立できた。

C4. ディルドリン及びDTTBの同時抽出法検討

ディルドリン及びDTTBは羊毛の防虫加工という同じ目的で使用されることから、これらを同時抽出できる方法があればより効率的な試験法ができると期待される。そこで本研究ではディルドリン・DTTB同時抽出法について検討した。

鹿庭ら(1979)¹⁾は抽出方法の検討において、単に標準溶液を添加した試料では実際の加工が施された試料を再現できないと報告している。そこで本研究では、過去にディルドリン及びDTTBが検出されたカーペット(ベージュ)を用いて検討を行った。

DTTBは酸性物質であるため、酸性の条件下で抽出することが望ましい。一方、ディルドリンは構造内にエポキシ基を有するため、酸によって加水分解するおそれがある。そこで、酸の添加量と各物質の抽出量を確認するため、カーペット(ベージュ)0.5gにメタノール50mLを加えたのち、濃塩酸を100 μ L、500 μ L、1000 μ L加えて70 $^{\circ}$ C、30分間還流抽出を行った。その結果、現行のディルドリン試験法で得られる抽出量に最も近かったのは、濃塩酸添加量100 μ Lの時であった。また、この時、DTTBも濃塩酸非添加時より多く抽出できた(図5)。さらに、濃塩酸を100 μ L添加した場合において現行試験法との比較を行ったところ、ディルドリン及びDTTBのいずれも現行試験法と同等に抽出できた(図6)。また、抽出後の残渣を鹿庭ら(1979)¹⁾の方法で再抽出したところ、ディルドリン及びDTTBはほとんど検出されなかった。このことから、濃塩酸100 μ Lを添加したメタノール50mLによって試料中のディルドリン及びDTTBのほぼ全量が抽出できることが分かった。

C5. 開発した試験法の性能評価

上記の検討結果から、図3に示した新試験法を考案し、その添加回収試験(n=6)を設定濃度2 μ g/g及び20 μ g/gで行ったところ、ディルドリン・DTTBの両物質で、回収率が94%以上104%未満、RSDが7%未満と、良好な結果を得ることができた。また、定量下限値はディルドリンが1.3 μ g/g、DTTBが0.7 μ g/gであった。この定量下限値は現行の基準値である30 μ g/gを大きく下回っており、試験法としての必

要条件を満たしていると考えられた。

D. まとめ

現在のディルドリン及び DTTB の試験法は制定から 30 年以上が経過し、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の使用、これら 2 物質に別々の試験法が規定されている非効率性などが問題となっている。本研究では、これら諸問題を解決し、安全かつ効率的な新規試験法を開発するための検討を行った。

現在の DTTB の試験法では GC で測定するために有毒な試薬の使用が問題視されているが、昨年度の検討でより安全で簡易に DTTB を誘導体化できる PTAH が有効であることが明らかとなった。しかしながら、今年度の検討の中で PTAH と試料マトリックスが混在した条件下でディルドリンのレスポンスが低下する現象が認められた。試験法の堅牢性確保のため、試験溶液は DTTB 試験用とディルドリン試験用に取り分けて測定することで対応することとした。

次に、妨害物質による GC/MS への負荷等の低減のため、試料抽出液の精製を検討した。本研究では、現在の分析現場でよく用いられる、簡易かつ溶媒使用量の少ない市販のミニカラムを使用した精製法を検討した。その結果、試料抽出液を液々分配でヘキササンに転溶した後、Bond Elut PRS で精製することで、妨害物質を大幅に除去し、かつディルドリン及び DTTB を損失なく回収できる効果的な精製法を開発することができた。

また、ディルドリン・DTTB 同時抽出法を検討した結果、試料 0.5 g をメタノール

50 mL 及び塩酸 100 μ L で還流抽出することにより、現試験法と同等かつ同時抽出できることが分かった。

以上の結果を踏まえ、図 3 に示した試験法を考案し、その性能を評価したところ、ディルドリン・DTTB の両物質で、回収率が 94%以上 104%未満、RSD が 7%未満と、良好な結果を得ることができた。また、定量下限値は現行の基準値である 30 μ g/g を大きく下回っており、試験法としての必要条件を満たしていると考えられた。今年度の検討で、現行法よりも効率性、安全性が優れた試験法が開発できた。

E. 研究発表

E1. 論文発表

なし

E2. 学会発表

- 1) 西以和貴・上村仁・河上強志: 家庭用品規制法における繊維製品中の防虫加工剤試験法改正に向けた検討, 第 55 回全国衛生化学技術協議会年会 (2018.11)
- 2) 西以和貴、上村仁、河上強志: 繊維製品中のディルドリン及び DTTB 試験法の開発, 日本薬学会第 139 年会 (2019.3)

F. 知的所有権の取得状況

7. 特許取得
なし
8. 実用新案登録
なし
9. その他

なし

G. 引用文献

- 1) 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

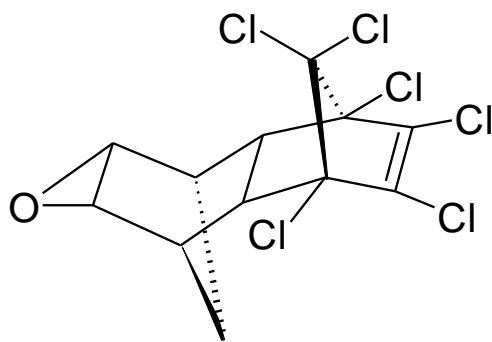
- 2) SRC, Inc.: FatePointers Search Module
<http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>
(2019.3.6 閲覧)
- 3) U.S.EPA: Chemistry Dashboard
<https://comptox.epa.gov/dashboard>
(2019.3.6 閲覧)

表1 試料マトリックスの有無及びPTAH溶液の添加の有無によるGC/MSレスポンスの比較 (ディルドリン 30 ng/mL)

		試料マトリックス	
		無し	有り
PTAHの 添加	無し	3680	3837
	有り	3456	3261
PTAHの添加 有り / 無し (%)		93.9	85.0

表2 各種市販ミニカラムにおける回収率の比較
 (ディルドリン・DTTB 各 1 µg/mL ヘキサン溶液 1 mL を負荷)

充填剤名	商品名 (充填剤量)	Recovery(%)	
		Dieldrin	DTTB
PRS	Bond Elut		
	PRS (1 g)	100.1	102.3
Si	Sep-pak		
	silica (690 mg)	118.2	101.1
FL	Sep-pak vac		
	Florisil (1 g)	99.4	78.5
PSA	InertSep		
	PSA (1 g)	1.2	1.6
NH2	InertSep		
	NH2 (1 g)	80.1	1.6
SAX	InertSep		
	SAX (1 g)	113.9	20.1



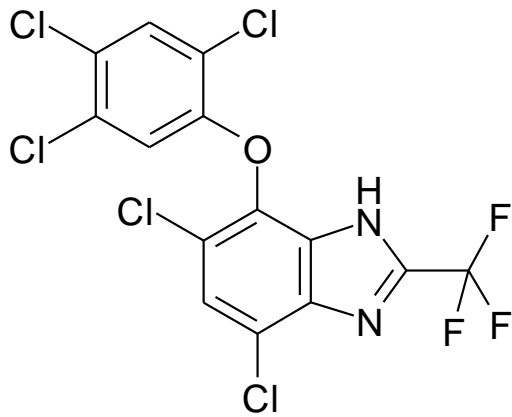
Cas No.: 60-57-1

Molecular Weight: 380.912

Boiling Point: 330°C

LogPow: 5.4

図1 デルドリンの構造式及び物性値等²⁾



Cas No.: 63405-99-2

Molecular Weight: 450.44

Boiling Point: 409°C(Predicted)

LogPow: 6.1 (Predicted)

図2 DTTB の構造式及び物性値等³⁾

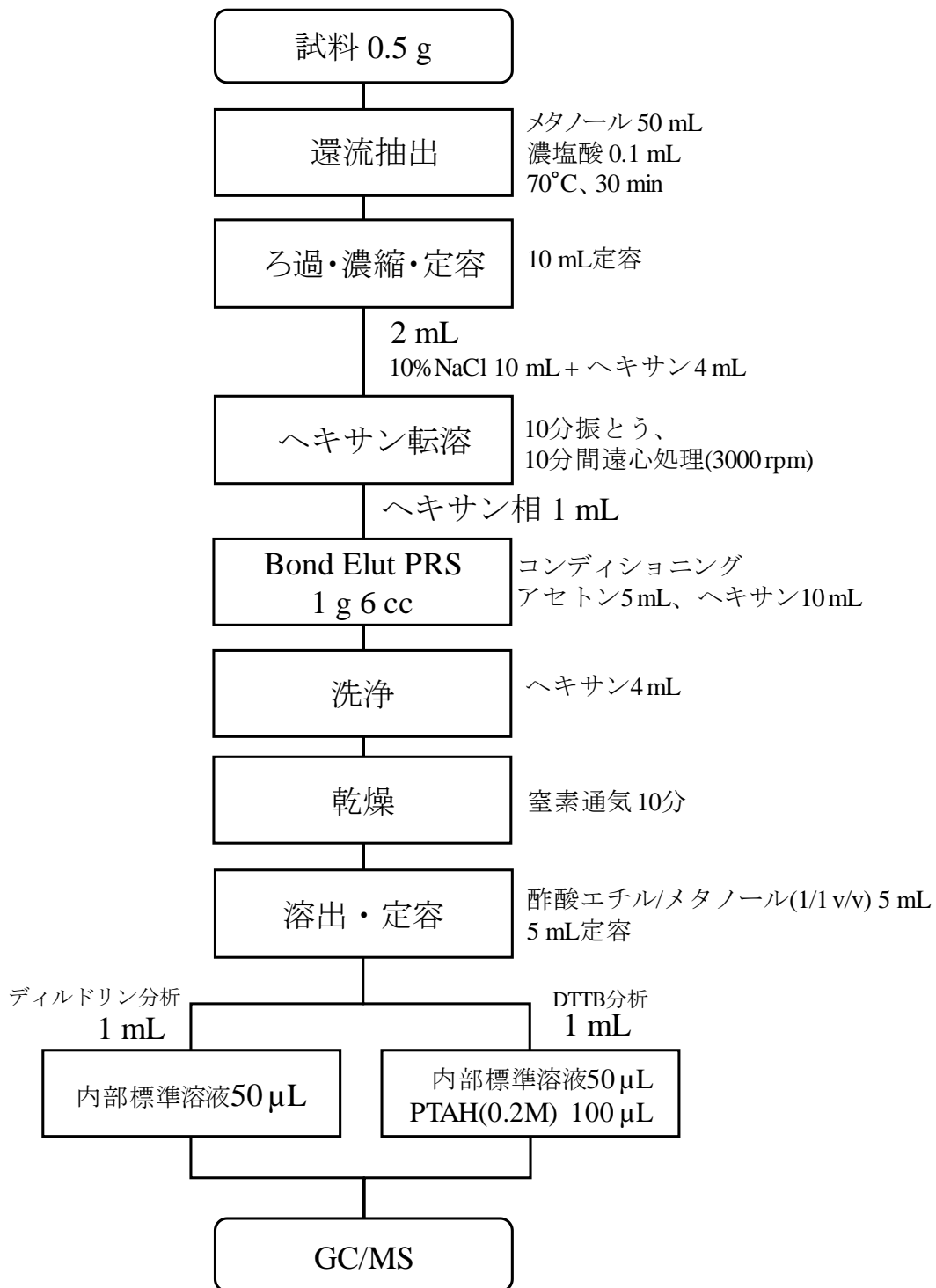


図3 新たに考案した試験法のフロー

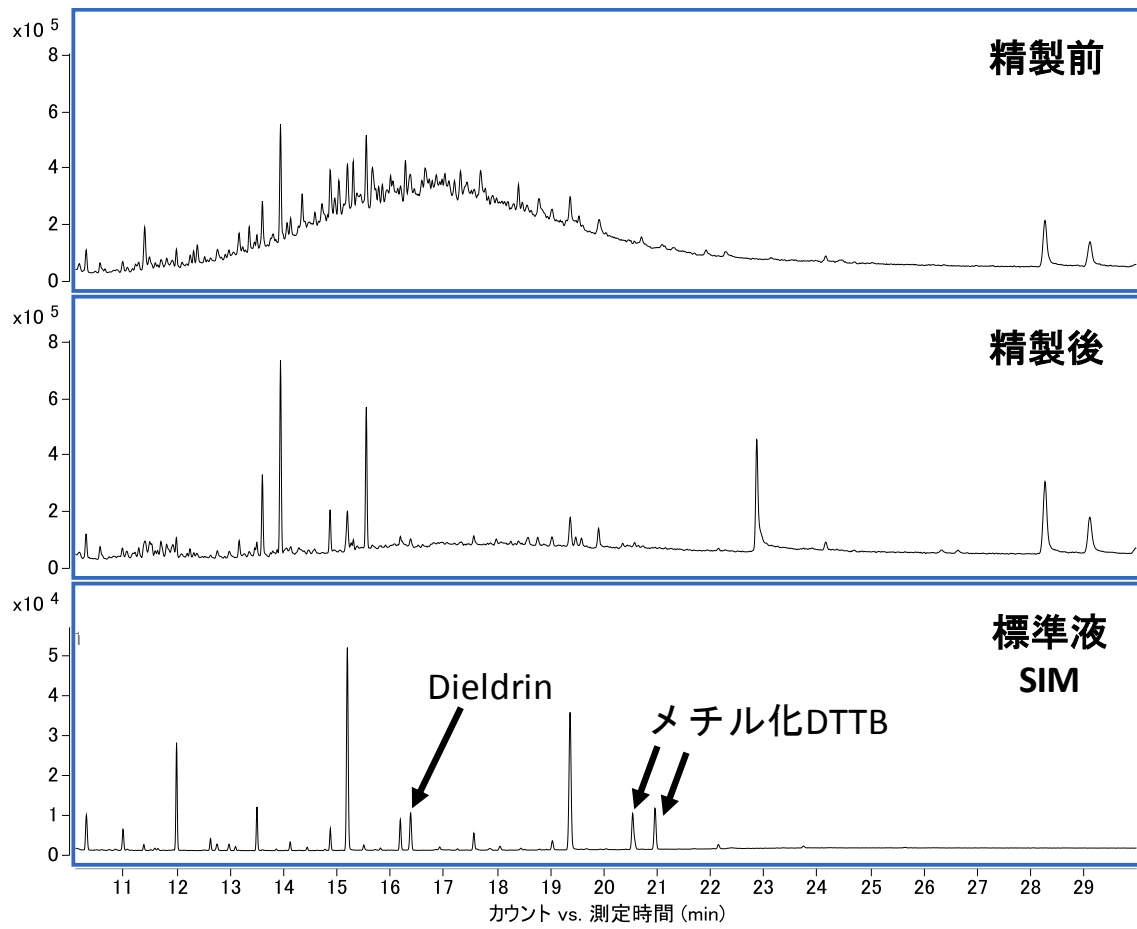


図4 試料抽出液の精製前後のスキャンクロマトグラム及び標準液のSIMクロマトグラム（標準液濃度：100 ng/mL）

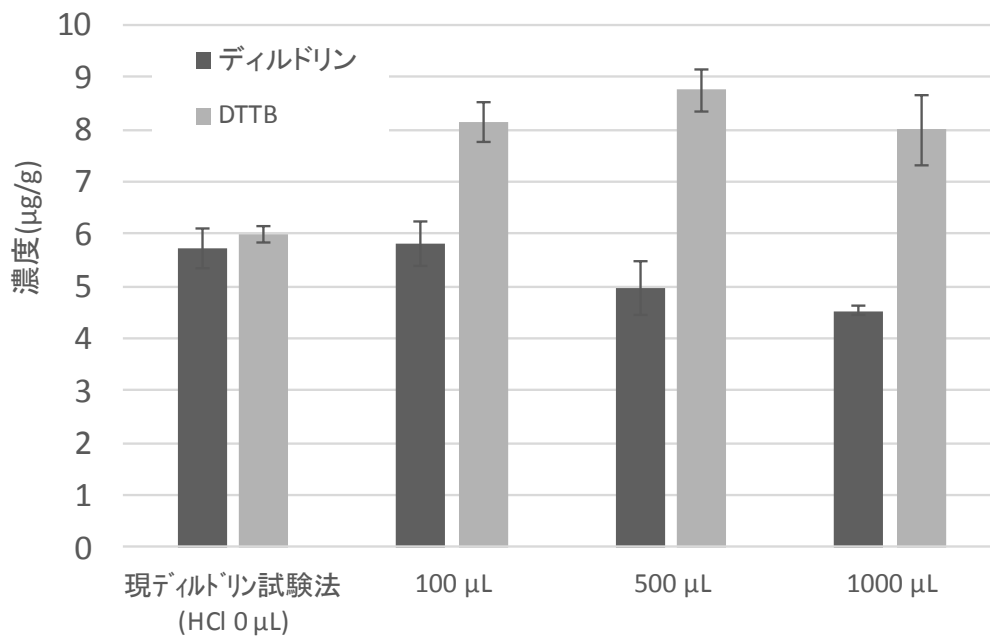


図5 塩酸添加量による抽出効率の比較 (試料:カーペット (ベージュ))
(各 n=4)

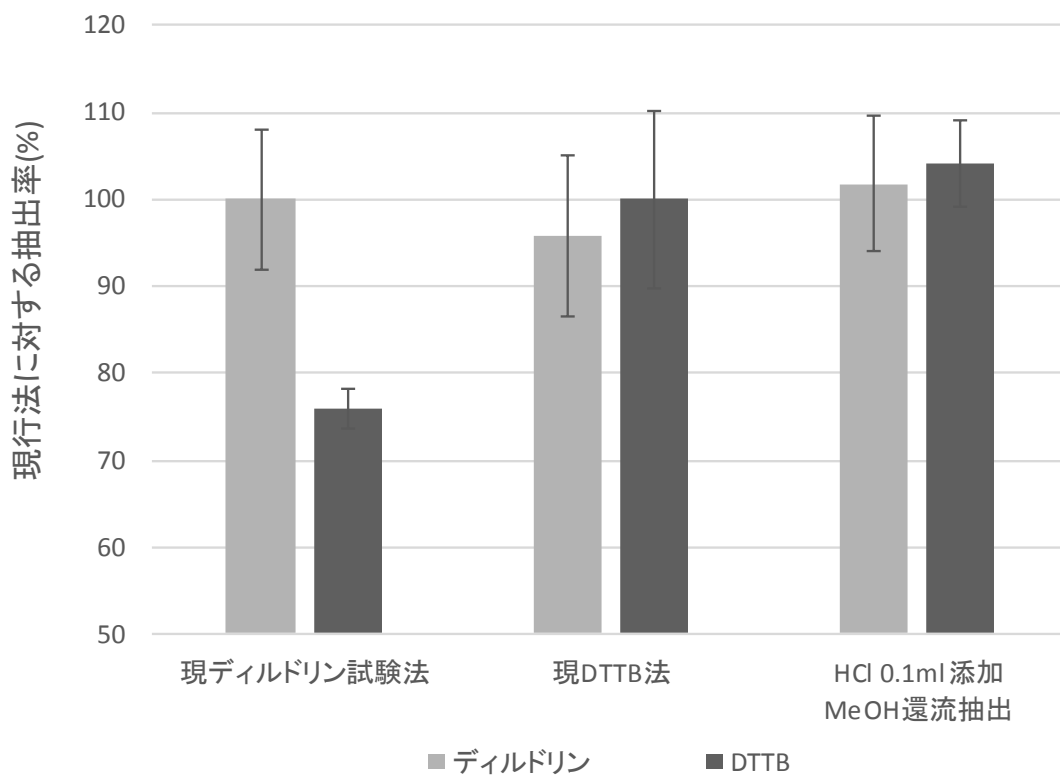


図 6 現行法に対する抽出率の比較

(デイルドリン、DTTB の現行試験法で抽出された濃度を 100 とした)