

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。これらの試験法は有害な試薬の使用や、今や主流ではない測定機器の使用、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。我々は昨年度までの研究で、これらの諸問題を解決し、安全かつ効率的な新試験法を開発した。今年度はこの新試験法の妥当性評価を行うべく、多機関バリデーションを実施した。また、昨今はヘリウムの需要増・供給減が問題となっていることから、新試験法で調製した試験溶液がヘリウムを用いない機器（水素キャリアガス-GC/MS 及び HPLC）で分析可能か否かを検討した。

参加 6 機関のうち、1 機関は GC/MS 分析におけるマトリックス効果の影響とみられる低回収率となったが、その他 5 機関で算出した現行基準値(30 µg/g)における平均回収率は 95~110%の間に入っており、併行精度は 5%未満、室間精度は 15%未満と、良好な結果が得られた。また、ディルドリン及び DTTB が含有される実際の試料(1975~1978 年入手)を各機関に配布し、試験を依頼したところ、併行精度 5%未満、室間精度 15%未満であったことから、安定した結果が得られることが分かった。実際の試料においても精度良く分析可能であることが示唆された。

また、1 機関で問題となったマトリックス効果について検討したところ GC/MS の測定条件や機器の状態でその影響の大きさが異なることが分かった。マトリックス効果の影響を軽減する方法として、ポリエチレングリコール 300 を測定溶液に加える手法を検討したところ、GC/MS の測定条件に依らず良好な結果が得られることを確認できた。

さらに、昨今のヘリウム不足に対応するため、水素キャリアガス-GC/MS 及び

HPLC/PDA を用いた分析法の検討を行ったところ、いずれも感度の面でヘリウムキャリアガス-GC/MS に劣るものの、現行基準値である 30 µg/g を下回る定量下限値が得られることがわかった。

## 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 40 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。

昨年度までの研究で、現行の試験法よりも効率性・安全性に優れた新試験法を開発した。今年度は、この新試験法の妥当性を評価するため、多機関によるバリデーションを実施した。

また、昨今、ヘリウム供給不安が問題となっていることから、ヘリウムを使用せずに分析可能な水素キャリアガス-GC/MS 及び高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器

(HPLC/PDA)の利用可能性について検討を行った。

## 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 は富士フィルム和光純薬製のものを用いた。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-d<sub>10</sub> は C/D/N isotope 社、クリセン-d<sub>12</sub> 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-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub> 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ーエルサイエンス製を用いた。ポリエチレングリコール 300 は和光純薬工業製の 1 級を用いた。塩化ナトリウム、リン酸、リン酸水素二ナトリウム・2 水和物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アジレント・テクノロジー社製の Bond Elut PRS (充填剤量 1 g)を用いた。

### B2. 試料

添加回収試験の試料として、100%ウールのフェルトを用いた。また、ディルドリン及び DTTB が検出される試料として、これらが規制される前（1975～1978 年）に購入したカーペット等 3 試料（表 1）を使用した。

### B3. バリデーション

昨年度までの研究で開発した試験法が他の機関でも適用可能か確認するために、国立医薬品食品衛生研究所、大阪府健康安全研究所、堺市衛生研究所、横浜市衛生研究所、千葉県衛生研究所及び神奈川県衛生研究所の合計 6 機関においてバリデーションを行った。

試料は B2 に示したフェルト約 0.5 g に 15 µg/mL 及び 150 µg/mL のディルドリン・DTTB 混合標準溶液を各 100 µL 添加し、1 晩ドラフト内で風乾した。これらの試料中濃度はそれぞれ 3 µg/g 及び 30 µg/g となる（試料 A 及び B）。また、加工剤で処理された試料からはディルドリンが抽出されにくいという報告<sup>4)</sup>があることから、表 1 に示した試料も各機関に配布した（試料 C～E）。

さらに、試料と同時にディルドリン及び DTTB の標準品、フルオランテン-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub>（B1 に記述）、Agilent Technologies DB-5ms UI（30 m × 0.25 mmID、膜厚 0.25 µm）、Bond Elut PRS を各機関に配布した。

### B4. 防虫加工剤試験法（図 3）

試料 0.5 g にメタノール 50 mL 及び濃塩酸 100 µL を加えた後、70℃、30 分間で還流抽出した。抽出液をガラスろ過器（細孔

記号 2）でろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、メタノールで 10 mL とした。この 2 mL を採り、10%（w/v）塩化ナトリウム水溶液 10 mL 及びヘキサン 4 mL を加えて振とう後、遠心処理を行った。ヘキサン相 1 mL を採り、予めアセトン 5 mL 及びヘキサン 10 mL でコンディショニングした Bond Elut PRS に負荷した。さらにヘキサン 4 mL で洗浄後、空気または窒素を用いてカラムに残存する溶媒を除去した。酢酸エチル/メタノール=(1/1 v/v) 5 mL で溶出し、同溶媒で 5 mL に定容した。

### B5. GC/MS 測定条件

測定用試料 1 µL 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 × 0.25 mmID、膜厚 0.25 µm）

注入方式：パルスドスプリットレス、1 µL、注入パルス圧 10 psi 1 分間

注入口温度：240℃

カラム温度：100℃(1 分)→(10℃/分)→240℃ →(5℃/分) →280℃(7 分)

トランスファーライン温度：280℃

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

フルオランテン-d<sub>10</sub> m/z 212

クリセン-d<sub>12</sub> 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

DTTB の定量はメチル化 DTTB-1 (Me-DTTB-1) のレスポンスを用いて行った。

また、ポリエチレングリコールを用いた検討時には、注入口温度を 270°C、カラム最終温度を 310°C (10 分)、トランスファーライン温度を 300°Cに変更した。

#### B6. 水素キャリアガス-GC/MS を用いた分析の検討

分析機器は Agilent Technology 社の 7890B GC/5977B MS を用いた。キャリアガス流量は、水素キャリアガス使用開始後 4 日目までは 0.6 mL/min、4 日目以降は 0.4 mL/min とした。カラムは Agilent Technology 社の DB-5MS UI (length, 20 m; inner diameter, 0.18 mm; film thickness, 0.18 μm)を用い、カラムオーブンプログラムは 100°C(0.5 分)→26°C/min→240°C→13°C/min→280°C(5 分)に設定した。試料注入は 2 μL をパルスドスプリットレスモード (50 psi, 1 min) で行った。注入口、トランスファーライン及びイオン源温度はそれぞれ 240°C、280°C、300°Cとした。定量イオン(m/z)は 263 (デイルドリン)、392 (Me-DTTB-1)、212 (フルオランテン-d<sub>10</sub>)、240 (クリセン-d<sub>12</sub>)とし、定性イオン(m/z)は 277 (デイルドリン)、464 (Me-DTTB-1)、106 (フルオランテン-d<sub>10</sub>)、236 (クリセン-d<sub>12</sub>)とし

た。水素キャリアガス使用開始後 3 日目にオートチューニングを行い、チューニングファイルを作成した。以降は同じチューニングファイルを用いて検討を行った。

#### B7. HPLC/PDA を用いた分析の検討

分析機器は島津製作所の Nexera X2 を用いた。カラムは化学物質評価研究機構の L-column 3 C18 (5 μm, 4.6×150 mm)及びジーエルサイエンス社の InertSustain Phenyl (5 μm, 4.6×150 mm)を用いた。InertSustain Phenyl は確認試験の用途に用いた。溶離液は A:50mM リン酸緩衝液(pH 2.6)、B:アセトニトリルを用い、流速 1 mL/min のグラジエントモードで通液した。溶離液の組成は、試料注入から 5 分間で A:B=50:50 から 20:80 まで直線的に変化させ、その組成を 15 分まで維持し、その後 20 分までに 50:50 へ直線的に変化させた。定量に用いた波長はデイルドリンで 215 nm、DTTB で 265 nm とした。B4 の方法で抽出した試料溶液については、窒素気流下で乾固後、溶離液 (A:B=50:50) に溶解したものを用いた。

#### B8. 水素キャリアガス-GC/MS 及び HPLC/PDA における添加回収試験及び定量下限値の算出

B6 及び B7 の各分析において、3μg/g 及び 30 μg/g における添加回収試験 (n=6) を行った。試料調製は B3 に示したとおりに行った。定量下限値は、原則 3 μg/g 添加試料における分析結果の標準偏差の 10 倍から求めた。なお、HPLC/PDA におけるデイルドリンの定量下限値のみ 30

μg/g の結果を用いて算出した。

## C. 結果及び考察

### C1. バリデーショナル試料の調製及び配布

予め、バリデーショナル試料調製用に用いたフェルトを B4 に示した試験法により分析し、ディルドリン及び DTTB の含有されていないことを確認した (n=2)。なお、B7 に示した測定条件で分析したところ、妨害となるピークも検出されなかった。

試料調製後、最初、中間、最後に標準溶液を添加した試料を 1 つずつとり、均一性を確認した。設定値に対する定量値の比は、試料 A のディルドリンが 93.3~99.2%、DTTB が 97.2~100.2% であり、相対標準偏差 (RSD) はディルドリンが 3.1%、DTTB が 1.7% であった。試料 B については、ディルドリンが 102.0~112.9%、DTTB が 102.4~103.8% であり、相対標準偏差 (RSD) はディルドリンが 5.1%、DTTB が 0.7% であった。これらの結果から、概ね設定値通りかつ均一に試料を調製できたと考えられた。

### C2. バリデーショナル結果

バリデーショナルは 6 機関で行った。各機関における GC/MS の分析条件を表 2 に示した。イオン源温度は 230~300°C に設定されており、各機関で様々であった。試料注入量は 5 機関で 1 μL としていたが、機関②では感度不足を補うために 5 μL としていた。また、機関⑥の注入口ライナーは他の機関とはやや構造の異なり、ライナー中間点にウールのあるスプリット/スプリットレス兼用のものを用いていた。

さらに、機関⑤ではマトリックス効果による増感現象が認められたため、B2 に示したフェルト抽出物をマトリックスとしたマトリックス検量線を用いて定量していた。

試料 A,B について、各機関の回収率を図 4,5 に示した。機関⑥が回収率 60~80% 程度の結果となっているが、その他 5 機関は全て 80% 以上の良好な回収率が得られていた。併行精度及び室間精度の計算を行ったところ、ディルドリンについては試料 A が 3.1% 及び 15.2%、試料 B が 3.5% 及び 17.7% であった。同じく DTTB については、試料 A が 3.8% 及び 19.9%、試料 B が 2.7% 及び 16.5% であった。併行精度はいずれも 5% を下回る良好な結果であった。室間精度は概ね 15~20% と、やや高い値となったが、回収率の低かった機関⑥の結果を除くと、すべての試料で 15% 未満となり、良好な結果が得られた。

試料 C~E は過去にディルドリン及び DTTB が検出された試料であり、加工剤を用いて処理されていると考えられる。加工剤で処理すると、ディルドリンが強固に羊毛に吸着され、抽出されにくくなるという報告<sup>3)</sup>があることから、このような試料でも精度良く分析可能かを確認するために試料 C~E についても各機関に分析を依頼した。

試料 C~E については、各機関の定量値を図 6,7 に示した。試料 A,B と同様に機関⑥で低値となっていた。併行精度及び室間精度の計算を行ったところ、ディルドリンについては試料 D が 3.3% 及び 15.5%、試料 E が 2.7% 及び 20.3% であった。DTTB については、試料 C が 4.1% 及び 1

4.5%、試料 E が 4.7%及び 17.2%であった。こちらにも室間精度が 15%を超えるやや高い値が多かったが、試料 A,B の時と同様に、定量値が低値であった機関⑥の結果を除くと、すべての試料で 15%未満となった。このことから、加工剤による処理があっても本分析法は精度良く分析可能であると考えられた。

6 機関における室間精度は 15%を超えるやや高い値となったが、全体的に報告値が低かった機関⑥の数値を除外すると、表 3 に示したとおり、良好な結果となった。これらの値は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」<sup>4)</sup>に示された最も厳しい基準である真度 70~120%、併行精度 10%未満、室内精度 15%未満を満たしていた。このことから、本研究で開発した試験法は、真度・精度ともに良好な性能を有していると考えられた。

一方で、機関⑥は全ての試料及び項目で他の機関より明らかに低値であった。各分析におけるばらつきが小さかったことと、ディルドリン・DTTB の両者とも概ね同様の回収率であったことから、試料の前処理工程ではなく、分析機器による測定が原因の可能性が考えられた。

### C3. 機関⑥における低回収率等に関する検討

回収率の低かった機関⑥の分析データを確認すると、試料溶液と標準溶液の内部標準物質のレスポンスの比が最大 200%となる、大きな正のマトリックス効果を受けていることが分かった。また、その効果はクリセン-d<sub>12</sub> よりもフルオランテ

ン-d<sub>10</sub>で大きかった。そこで、分析対象物質のレスポンスのみによる絶対検量線法で定量を行うと、回収率が図 8 の様に改善された。これらのことから、機関⑥における回収率等の低値は GC/MS 分析におけるマトリックス効果が主たる原因と考えられた。

機関⑥の GC/MS 条件は当所のものから 1.注入口ライナーの種類、2.高圧注入の有無、3.カラム流速、4.イオン源温度において違いがあったことから、これらがマトリックス効果に与える影響を検討した。まず、当所と機関⑥の条件において、マトリックスを添加した標準溶液 (0.1 µg/mL) を定量し、マトリックス効果の有無を確認した。マトリックスはバリデーショント料 A,B の調製に用いたフェルトの抽出物を使用した。

検討の結果、当所の条件よりも機関⑥の条件でマトリックス効果が大きいものが多く、マトリックス添加標準溶液の定量値真度が 137%になるものがあつた (表 4、5)。当所の分析条件では、定量値真度は概ね 100%で良好なものの、各レスポンスはマトリックス効果により大きな増感現象が認められた。

機関⑥の分析結果は、内部標準物質のみが大きなマトリックス効果を受けていたように見られるが、当所の検討では分析対象物質のマトリックス効果の方が大きく、同様の結果とならなかった。マトリックス効果は普段測定している試料由来の汚れ等、機器の状態に依存して変わる可能性が高いため、このような差異が生じたと考えられた。

マトリックス効果の程度は機器の状態

に影響を受けると考えられるため、検査結果の精度確保のためにその対策が必要と考えられた。マトリックス効果の影響を軽減するためには、マトリックス検量線の作成やアナリティカルプロテクタント (AP) の使用が効果的ということが知られている。マトリックス検量線は、機関⑤がそれを用いることで良好な結果を報告してきていることから、有効な方法であることが示されたと考えられた。また、当所において代表的な AP であるポリエチレングリコールを用いた分析法について検討を行った。検討にあたっては、ポリエチレングリコール 300 を標準溶液及び試料溶液に 500 µg/mL になるように添加し、当所及び機関⑥の条件を用いて分析を行った。その結果、表 6,7 に示したように、標準溶液と試料溶液のレスポンスの差がほとんど無く、かつマトリックス添加標準溶液の定量値真度が最大でも 110.6%と、良好な結果が得られることが分かった。特に、当所の条件ではディルドリンの真度が 104.3%、DTTB が 98.4%であり、非常に良好な結果であった。

以上のことから、本研究で開発した試験法は概ね良好な真度及び精度が得られる試験法と考えられたが、一方でマトリックス効果により異常値を与える可能性が示唆された。したがって、公定法への摘要に当たっては、各試験機関でマトリックス効果の検証及び対策を行うことが必要であると考えられた。対策の例として、マトリックス検量線やポリエチレングリコールを用いた分析法が対策として効果的であることが示唆された。

### C3. 水素キャリアガス-GC/MS を用いた分析の検討

水素キャリアガス-GC/MS の検討に当たっては、これまで使用してきた GC/MS のヘリウムのラインに 3 方コックで水素のラインを取り付け、水素をキャリアガスとして使用できるようにした機器を用いた。キャリアガスを水素に切り替えた後 3 日目において、窒素 ( $m/z28$ ) の値が十分に下がったことを確認し、オートチューニングを行ってから検討を始めた。

アジレント・テクノロジー社の資料<sup>5)</sup>によると、水素キャリアガスへの切り替え後、水素の還元作用によって配管等の汚れが溶出されることから、1 週間程度ベースラインが高い状態が続く場合があると報告されている。そこで、3 日目及び 10 日目に溶媒 (酢酸エチル/メタノール=1/1) のスキャンデータをとった (図 9)。10 日目でベースラインの低下が落ち着いた。当所の装置は設置場所等の都合により、ガス精製管以降の水素配管が比較的長くなっている。このようなケースでは、ベースラインの安定化には 10 日間程度かかるケースがあることが分かった。また、クロマトグラフの最初にベースラインの顕著な上昇が認められるが、これも 10 日目に比較的小さくなった。この最初のベースライン上昇はイオン源フィラメントを点灯する時間を変化させても同様に認められることから、イオン源に付着した汚れ等がイオン化した水素に反応して検出されたものと考えられた。

ベースライン安定化の検討と併行して、分析対象物質のアバンダンスの変化

に関する検討を行った。今回の分析対象物質はディルドリン及び DTTB であるが、DTTB は測定にメチル誘導体化が必要であり、誘導体化試薬と水素の複合的な影響が不明であることから、DTTB はディルドリンの検討後に検討することとした。また、合わせてこれらの内標準物質であるフルオランテン-d<sub>10</sub> 及びクリセン-d<sub>12</sub> についても検討を行った。

水素キャリアガス変更から 3 日目にディルドリン 0.03 µg/mL 及び、フルオランテン-d<sub>10</sub> 0.5 µg/mL、クリセン-d<sub>12</sub> 0.5 µg/mL の標準液を分析したところ、ディルドリンのピークは積分が困難なほど小さく、クリセン-d<sub>12</sub> のピークにはヘリウムキャリアガスの時には認められなかった顕著なテーリングが認められた。クリセン-d<sub>12</sub> のテーリングは定性イオン m/z236 が定量イオン m/z240 より顕著であり、4 日目においてもその傾向に変化はなかった (図 10)。この現象は水素によるイオン化への影響と考えられたことから、質量分析計に到達する水素の量を減らすため、カラム流量を当初の 0.6 mL/min から 0.4 mL/min に減らした。その結果、テーリングがやや小さくなり、m/z236 と m/z240 のピーク形状の差が小さくなった。さらに、その後の 7 日目にはテーリングはほぼ認められなくなった (図 10)。この結果から、このテーリングには、水素によるイオン化への影響に加え、配管等から溶出されてきた汚れも影響していると考えられた。以上のことから、水素キャリアガスを用いる際は、ピーク形状を確認する必要があり、テーリング等が認められた場合は水

素ガスの流量を下げるのが有効であることが示唆された。

キャリアガス流量を 0.4 mL/min にした 4 日目以降の、ディルドリン、フルオランテン-d<sub>10</sub> 及びクリセン-d<sub>12</sub> のレスポンスの変化を図 11 に示した。フルオランテン-d<sub>10</sub> 及びクリセン-d<sub>12</sub> は 7 日目にはほぼ安定化していたのに対し、ディルドリンは 7 日目から 8 日目に急激にレスポンスが上昇し、以降 10 日目まで上昇し続けた。前述のとおり、ベースラインも 10 日目以降に安定化が認められたことから、以上のレスポンスの変化はベースラインによる影響が大きいと考えられた。また、今回の結果から、化合物ごとに安定化までの挙動が異なっていることから、水素キャリアガスを用いる際は、すべての分析対象物質の測定の安定化を確認するまでは定量分析を行うのを控えるべきであることが示唆された。

ディルドリンの測定の安定化が確認できた後に、ディルドリンの検量線を作成したところ、R<sup>2</sup>=0.99 以上の直線性の高い検量線が得られた (図 12)。また、本研究で開発した新試験法を用いて添加回収試験を n=6 で行った。その結果、回収率及び RSD は、基準値 30 µg/g で 98.5%及び 1.0%、基準値の 1/10 である 3 µg/g で 88.7%及び 6.8%であった。3 µg/g での添加回収試験における定量値の標準偏差の 10 倍にて定量下限値を算出したところ、1.8 µg/g であった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は 1.3 µg/g であり、そこからやや数値は上昇したものの、基準値より十分に低い値であることが分かった。以上より、繊維製品



中のディルドリンの分析に水素キャリアガス-GC-MSは利用可能と考えられた。

DTTBはベンゾイミダゾール骨格を有することから、GC測定に当たっては誘導体化が必要である。今回の新試験法では、注入口でメチル化反応が進行する Phenyltrimethylammonium Hydroxide (PTAH)を用いている。これまで、PTAHを水素キャリアガスで用いた事例は報告されておらず、その影響は未知であったが、検討の結果、ヘリウムキャリアガス時と同様に誘導体化反応が起きることが分かった。そこで、DTTBの検量線を作成したところ、ディルドリンの時と同様に良好な直線性が得られた(図13)。また、添加回収試験の結果、回収率及びRSDは基準値30 µg/gで105.6%及び3.3%、基準値の1/10である3 µg/gで89.1%及び4.5%であった。3 µg/gでの添加回収試験における定量値の標準偏差の10倍にて定量下限値を算出したところ、1.3 µg/gであった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は0.72 µg/gであり、そのおおよそ2倍の値となったものの、基準値より十分に低い値であることが分かった。以上より、繊維製品中のDTTBの分析にも水素キャリアガス-GC-MSは利用可能と考えられた。

以上の検討により、ヘリウムの代替として水素をキャリアガスとして用いたGC-MSが利用可能であり、誘導体化試薬PTAHも問題なく使用可能であることが分かった。

#### C4. HPLC/PDAを用いた分析の検討

ヘリウム不足時に水素キャリアガス-

GC/MSの使用が困難な検査機関も存在すると考えられることから、HPLC/PDAを用いた代替分析法についても検討を行った。

ディルドリンのUVスペクトルは図14のとおりであり、吸収極大波長は215 nmであった。このことから、ディルドリンの定量に用いる波長は215 nmが適切であると考えられた。0.05-2 µg/mLにおける検量線を作成したところ、図15のように $R^2=0.99$ 以上の直線性の高い検量線が得られた。

一方、DTTBのUVスペクトルは図16であり、吸収極大波長は203 nm、265 nmであった。三好ら<sup>6)</sup>はDTTB分析に波長220 nmを用いていたが、添加回収試料の試料溶液のクロマトグラムを確認すると、波長265 nmにおいて妨害ピークが少ない良好なクロマトグラムが得られることがわかった(図17)。したがって、DTTBの定量に用いる波長は265 nmとした。0.01-2 µg/mLにおける検量線を作成したところ、図18のとおり $R^2=0.99$ 以上の直線性の高い検量線が得られた。

ディルドリンの添加回収試験を30 µg/g添加試料で行ったところ、回収率は103.5%、RSDは1.7%と良好な結果が得られた。また、DTTBの添加回収試験は3 µg/g及び30 µg/g添加試料で行ったところ、回収率はそれぞれ105.9%及び100.6%、RSDは4.2%及び2.1%と良好な結果が得られた。ディルドリンは30 µg/g、DTTBについては3 µg/gにおける添加回収試験の結果を用いて定量下限値を算出したところ、5.2 µg/g及び1.3 µg/gであった。これらの値は基準値より十分に低い値であつ

た。

しかしながら、HPLCはGC/MSでの分析よりも得られる定性情報が少ないことから、別途確認方法が必要と考えられた。本研究で用いたPDA検出器はUVスペクトルを同時に得ることが可能であるため、標準溶液と試験溶液のスペクトルを比較することで、確認が可能と考えられる。実際に前述の添加回収試験の試料で比較を行ったところ、図19の様に良好な一致が認められた。また、更なる確認手法として、異なる保持メカニズムのカラムを用いた時の保持時間を比較する手法を検討した。本研究では、芳香族化合物に特異性の高いInertSustain Phenylカラムを用いて分析を行ったところ、図20に示したようにクロマトグラムは大きく変化したが、標準溶液と添加回収試験試料溶液の各物質の保持時間はよく一致した。このことから、異なるカラムでの確認試験も可能であることが示唆された。

以上のことから、GC/MSでの分析よりも感度の面で不利はあるものの、HPLC/PDAも代替分析法として利用可能であると考えられた。

#### D. まとめ

本年度の研究では、昨年度までの検討結果から開発した新試験法の多機関バリデーションを行った。参加6機関のうち、1機関はマトリックス効果の影響とみられる低回収率となったが、その他5機関で算出した現行基準値(30 µg/g)における平均回収率は95~110%の間に入っており、併行精度は5%未満、室間精度は15%未満と、良好な結果が得られた。また、ディル

ドリン及びDTTBが含有される実際の試料(1975~1978年入手)を各機関に配布し、試験を依頼したところ、併行精度5%未満、室間精度15%未満であったことから、安定した結果が得られることが分かった。実際の試料においても精度良く分析可能であることが示唆された。

また、1機関で問題となったマトリックス効果について検討したところGC/MSの測定条件や機器の状態でその影響の大きさが異なることが分かった。マトリックス効果の影響を軽減する方法として、ポリエチレングリコール300を測定溶液に加える手法を検討したところ、GC/MSの測定条件に依らず良好な結果が得られることを確認できた。

さらに、昨今のヘリウム不足に対応するため、水素キャリアガス-GC/MS及びHPLC/PDAを用いた分析法の検討を行ったところ、いずれも感度の面でヘリウムキャリアガス-GC/MSに劣るものの、現行基準値である30 µg/gを下回る定量下限値が得られることがわかった。このことから、これらによる分析法が代替法として利用可能であると考えられた。

#### E. 研究発表

##### E1. 論文発表

- 1) 西以和貴、佐藤学、仲野富美、辻清美、上村仁、河上強志. (2020) 繊維製品中のディルドリン及びDTTB分析法の開発, YAKUGAKU ZASSHI, in press.

##### E2. 学会発表

- 1) 西以和貴、上村仁、河上強志： 繊維製品中防虫加工剤の改正分析法検討において得られた抽出法に関する知見, 第 56 回全国衛生化学技術協議会年会 (2019.12)
  - 2) 西以和貴、上村仁、河上強志： 水素キャリアガス-GC-MS を用いた繊維製品中のディルドリン及び DTTB の分析法について, 令和元年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第 32 回理化学研究部会・研究会 (2020.2)
  - 2) U.S.EPA: Chemistry Dashboard  
<https://comptox.epa.gov/dashboard>  
(2020.3.28 閲覧)
  - 3) Ohto, M., Kodama, S., Saito, Y., & Yamamoto, A. (2006). Determination of dieldrin in wool products by gas chromatography with microwave - assisted extraction. *Journal of separation science*, 29(18), 2759-2764.
  - 4) 厚生労働省 (2007) . 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン
  - 5) 代島茂樹, 水素キャリアーガスによる GC/MS 分析の基礎 2013.2.22 GC 研究懇談会  
[http://www.jsac.or.jp/group/GC/doc\\_files/323GCMScarriergas.pdf](http://www.jsac.or.jp/group/GC/doc_files/323GCMScarriergas.pdf)
  - 6) 三好保, 石川英樹, 藤井正信, & 黒田弘之. (1984). 高速液体クロマトグラフィーによる羊毛繊維製品中の防虫加工剤 4,6 - ジクロロ - 7 - (2,4,5 - トリクロロフェノキシ) - 2 - トリフルオロメチルベンゾイミダゾール (DTTB) の定量法. *日本衛生学雑誌*, 39(3), 640-646.
- F. 知的所有権の取得状況**
10. 特許取得  
なし
  11. 実用新案登録  
なし
  12. その他  
なし
- G. 引用文献**
- 1) U.S. National Library of Medicine: PubChem  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>  
(2020.3.28 閲覧)

表1 バリデーションにおいて各機関に配布した試料

- ・試料 A,B は神奈川県衛生研究所で標準液をフェルトに所定濃度になるよう添加した試料
- ・試料 C-E は 1975～1978 年に入手したディルドリン及び DTTB が検出される試料。記載の濃度は、神奈川県衛生研究所での測定結果

記号	試料タイプ	ディルドリン ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD%	DTTB ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD%
A	フェルト	3.0	-	3.0	-
B	フェルト	30.0	-	30.0	-
C	じゅうたん	<LOQ	-	51.8	4.5
D	ドスキン	5.3	0.4	<LOQ	-
E	じゅうたん	5.8	7.5	8.1	4.8

表2 バリデーション参加機関の使用機器及び分析条件 (①は当所の条件。表にはB5に示された条件から変更されたことが多かったもののみ記載)

機関記号	①	②	③	④	⑤	⑥
機器	Agilent 7890B/5977B	Agilent 6890N/5973	Agilent 7890B/7000D	Agilent 7890B/5977B	ThermoFisher Scientific FocusGC/DSQII	Agilent 7890B/5977B
注入量 ( $\mu$ L)	1	5	1	1	1	1
注入口	スプリットレスライナー ウールあり	スプリットレスライナー ウールなし	スプリットレスライナー ウールあり	スプリットレスライナー ウールなし	スプリットレスライナー ウールなし	スプリット/スプリット 兼用ライナー ウールあり
ライナー	ウールあり	ウールなし	ウールあり	ウールなし	ウールなし	なし
高圧注入の 有無	あり	あり	あり	あり	なし	なし
カラム流速 (mL/min)	0.6	0.6	0.6	0.6	1	1
イオン源温度 ( $^{\circ}$ C)	300	250	280	300	250	230

表 3 バリデーション結果一覧（参加 6 機関中、報告値が低かった 1 機関を除外して計算）

対象物質	試料	真度 (%)	併行精度 (%)	室間精度 (%)
ディルドリン	A	104.6	3.0	11.4
	B	97.2	3.4	9.7
	C	-	-	-
	D	-	3.2	7.4
	E	-	-	-
DTTB	A	107.0	3.6	8.6
	B	96.1	2.6	9.8
	C	-	4.3	13.1
	D	-	-	-
	E	-	4.4	11.5

表 4 デイルドリン分析における GC/MS 分析条件の影響 (条件は B5 及び表 2 を参照)

	マトリックス	当所条件	機関⑥条件
デイルドリン (0.1 µg/mL)	なし	9635	1546
レスポンス	あり	13873	3346
フルオランテン-d <sub>10</sub>	なし	122853	20049
レスポンス	あり	165401	30922
デイルドリンレスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		144.0	216.4
フルオランテン-d <sub>10</sub> レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		134.6	154.2
マトリックス添加試料の 定量値真度(%)		106.1	137.2

表 5 DTTB (Me-DTTB-1) 分析における GC/MS 分析条件の影響  
(条件は B5 及び表 2 を参照)

	マトリックス	当所条件	機関⑥条件
Me-DTTB-1 (0.1 µg/g)	なし	8179	1327
レスポンス	あり	12946	2663
クリセン-d <sub>12</sub>	なし	44246	6727
レスポンス	あり	72181	9486
Me-DTTB-1 レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		158.3	200.7
クリセン-d <sub>12</sub> レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		163.1	141.0
マトリックス添加試料の 定量値真度(%)		97.6	120.6

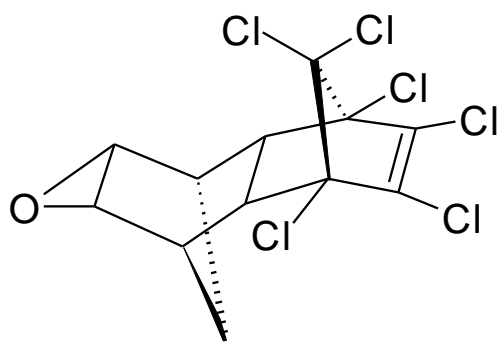
表 6 ポリエチレングリコール 300 添加後のディルドリンの分析結果  
(条件は B5 及び表 2 を参照)

	マトリックス	当所条件	機関⑥条件
ディルドリン (0.1 µg/mL)	なし	13978	2725
レスポンス	あり	14506	2844
フルオランテン-d <sub>10</sub>	なし	215634	215634
レスポンス	あり	217593	217593
ディルドリンレスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		103.8	104.4
フルオランテン-d <sub>10</sub> レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		100.9	100.9
マトリックス添加試料の 定量値真度(%)		104.3	108.3

表 7 ポリエチレングリコール 300 添加後の DTTB の分析結果  
(条件は B5 及び表 2 を参照)

	マトリックス	当所条件	機関⑥条件
Me-DTTB-1 (0.1 µg/g)	なし	24482	4912
レスポンス	あり	26028	5593
クリセン-d <sub>12</sub>	なし	82703	23822
レスポンス	あり	90318	23792
Me-DTTB-1 レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		106.3	113.9
クリセン-d <sub>12</sub> レスポンス比 (%) (マトリックスあり/なし)		109.2	99.9
マトリックス添加試料の 定量値真度(%)		98.4	110.6





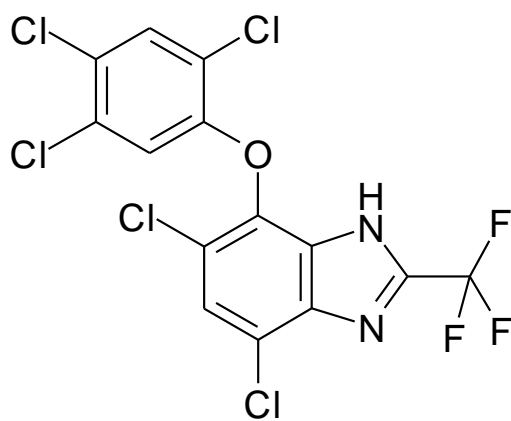
Cas No.: 60-57-1

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<sup>1)</sup>



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<sup>2)</sup>

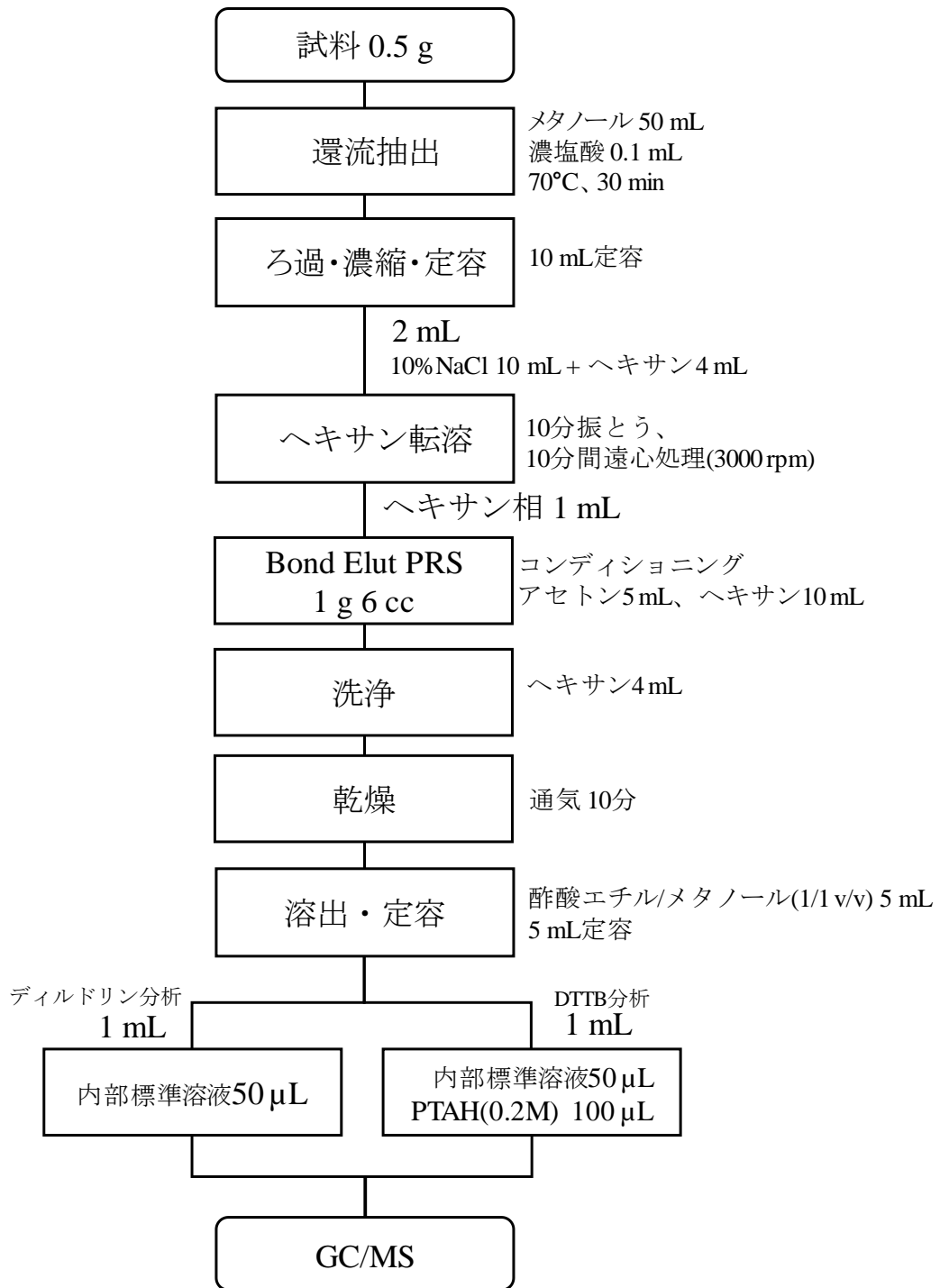


図 3 試験法のフロー

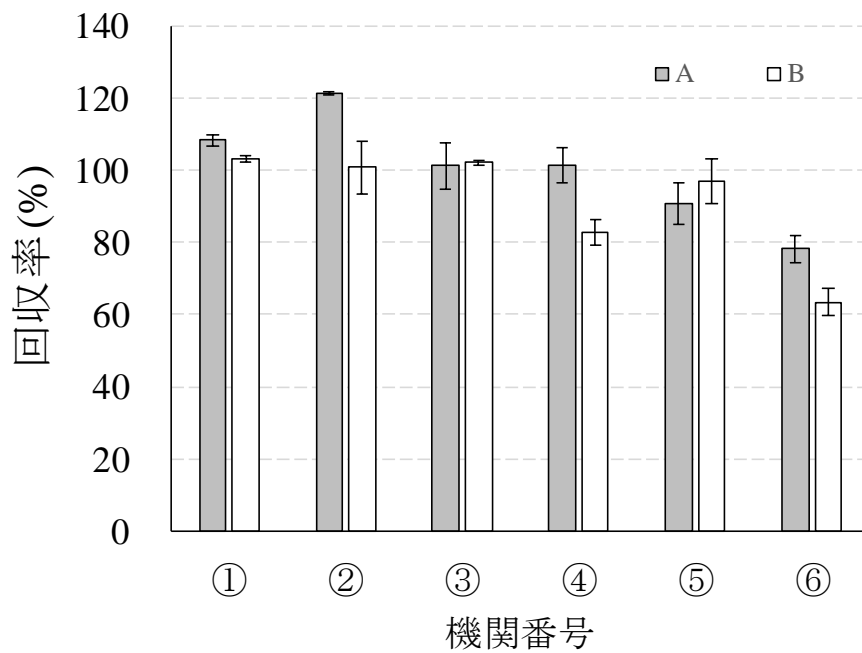


図4 試料 A (3 µg/g 添加試料) 及び試料 B (30 µg/g 添加試料) における各機関の

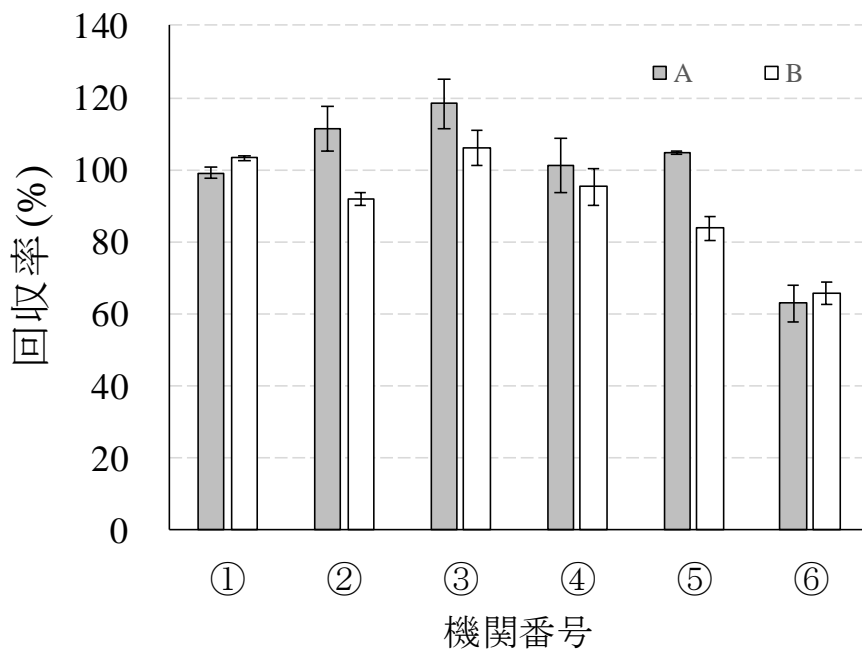


図5 試料 A (3 µg/g 添加試料) 及び試料 B (30 µg/g 添加試料) における各機関の DTTB の回収率

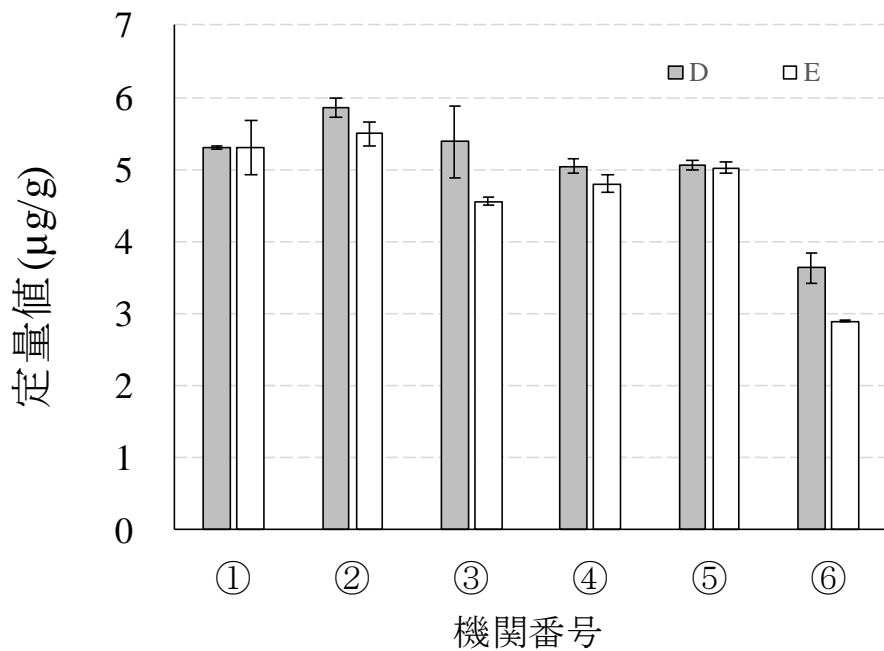


図6 試料 D、E における各機関のディルドリンの定量値 (C は不検出)

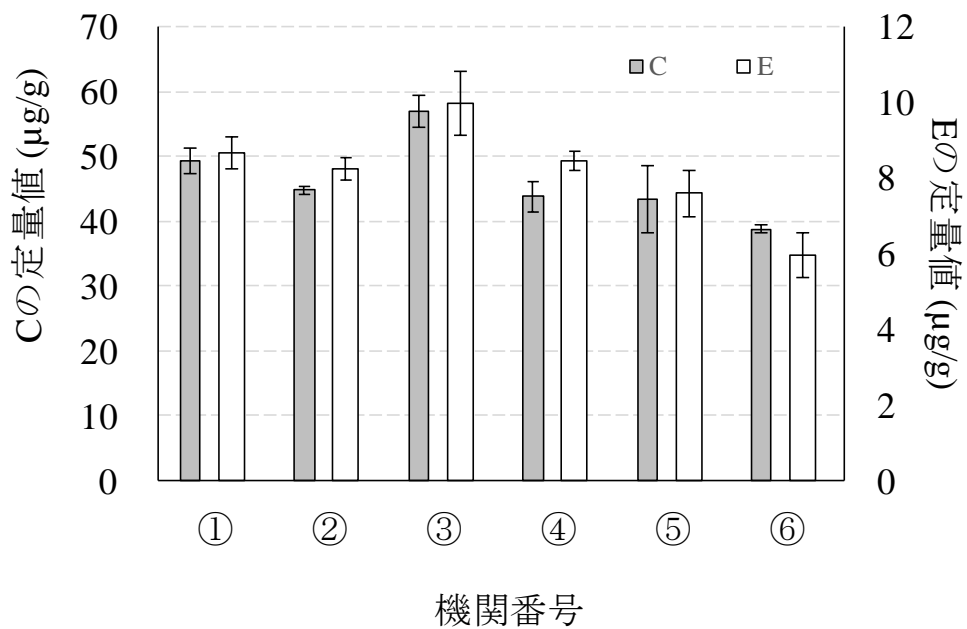


図7 試料 C、E における各機関の DTTB の定量値 (D は不検出)

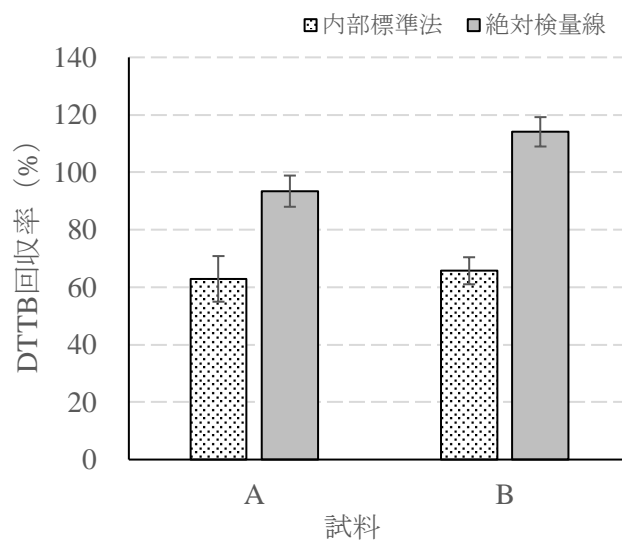
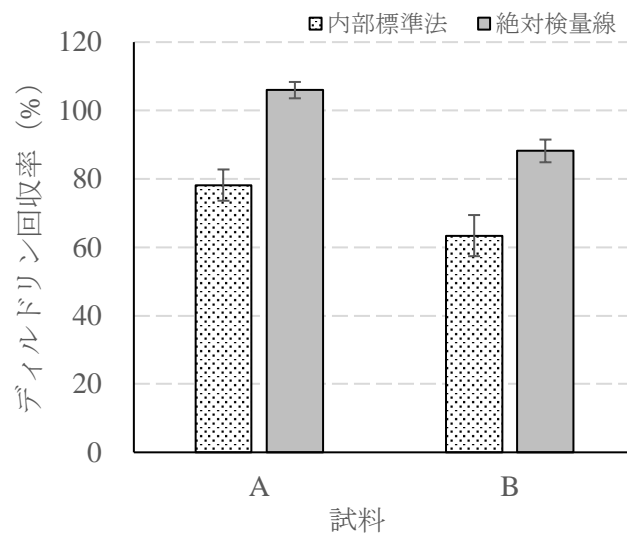


図 8 機関⑥における内部標準法を用いた場合と絶対検量線法を用いた場合の回収率の違い  
 (上：デイルドリン、下：DTTB)

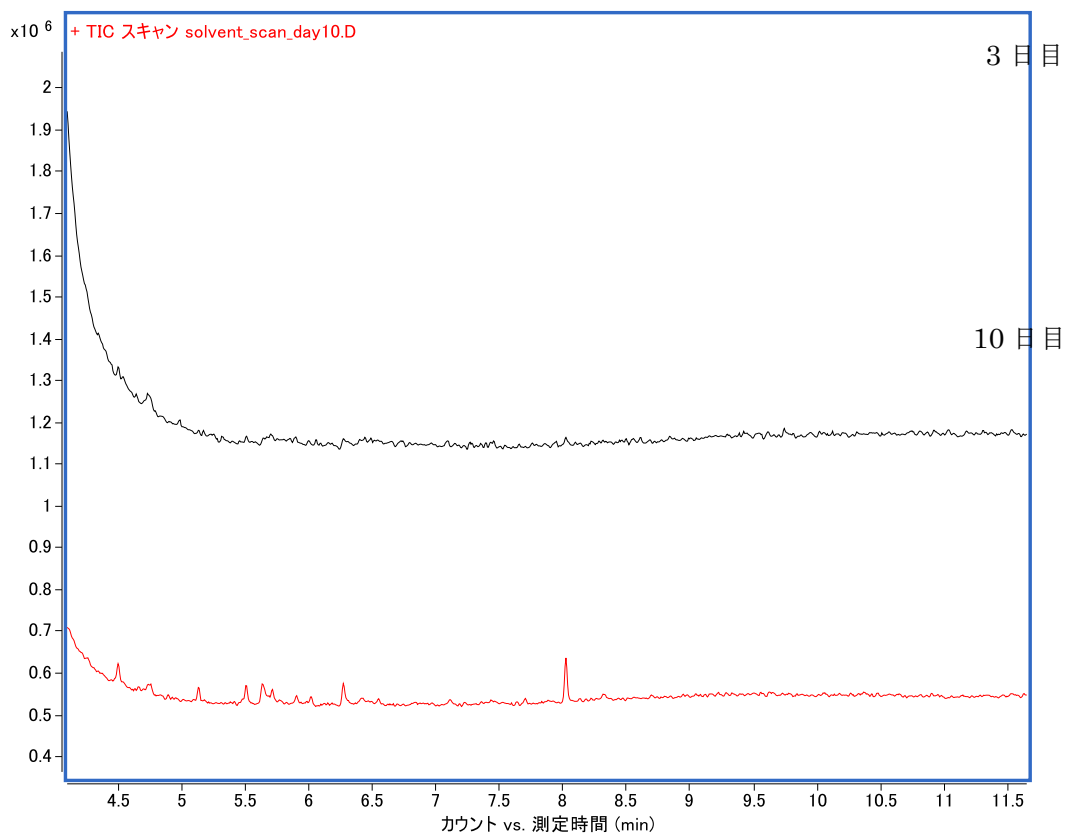
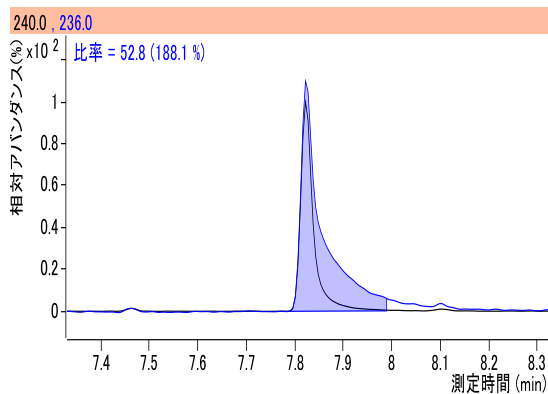
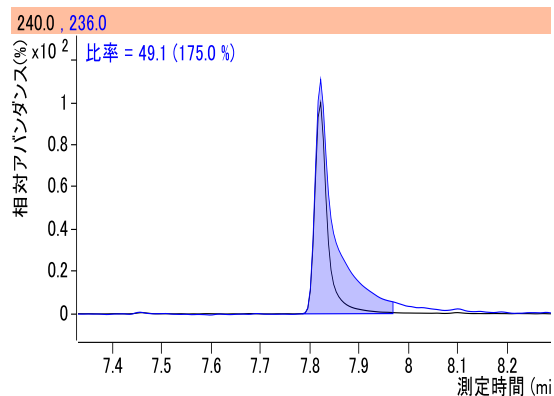


図9 水素キャリアガス切り替え後のベースラインの変化

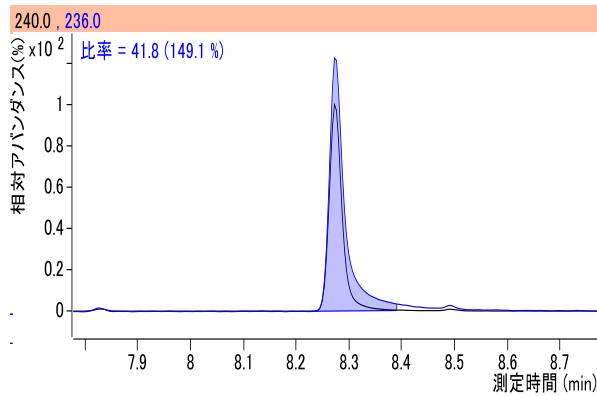
3日目 (流量0.6ml/min)(クリセン)



4日目 (流量0.6ml/min)



4日目 (流量0.4ml/min)



7日目 (流量0.4ml/min)

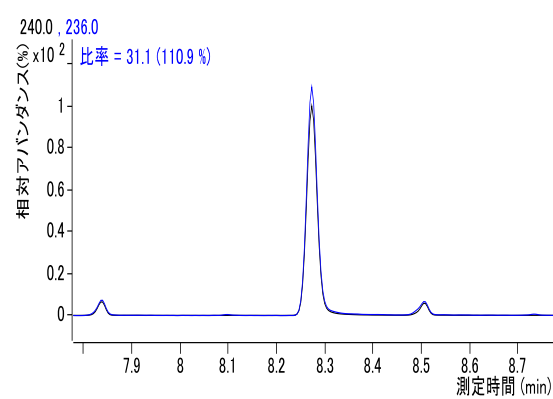


図 10 水素キャリアガス切り替え後の経過時間及び流量によるクリセン-d<sub>12</sub>のピーク形状の変化



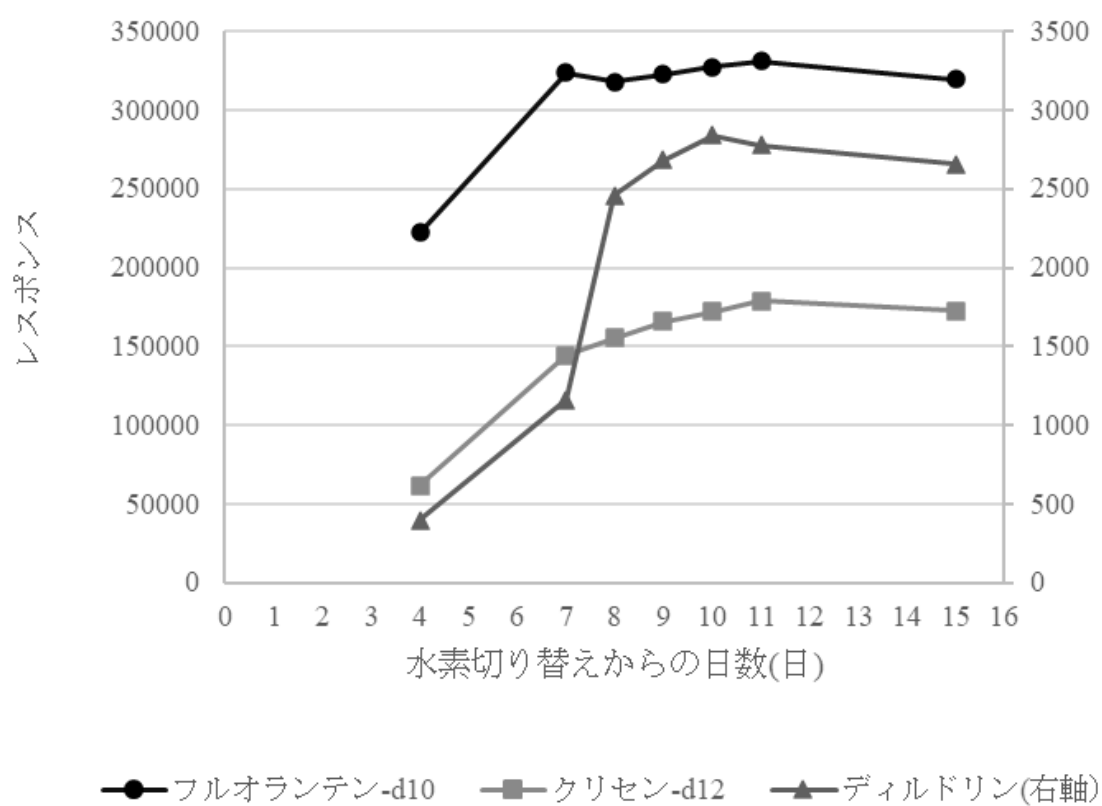


図 11 水素キャリアガス切り替え後の各分析対象物質のレスポンスの変化

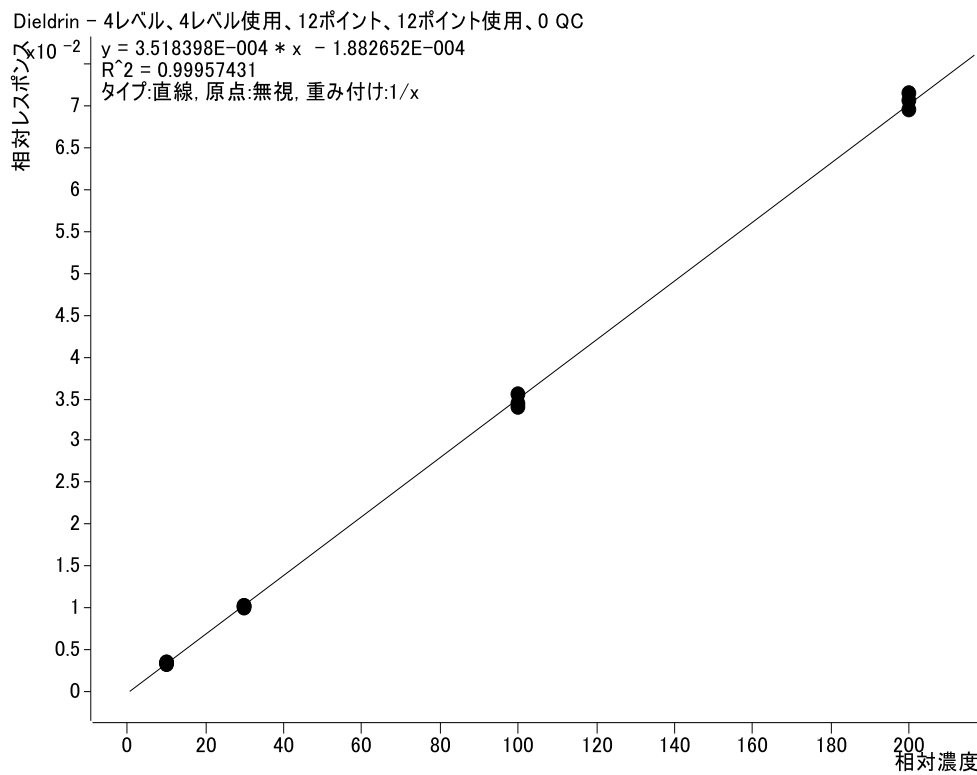


図 12 水素キャリアがガス-GC/MS におけるディルドリンの検量線(0.01-0.2 µg/L)

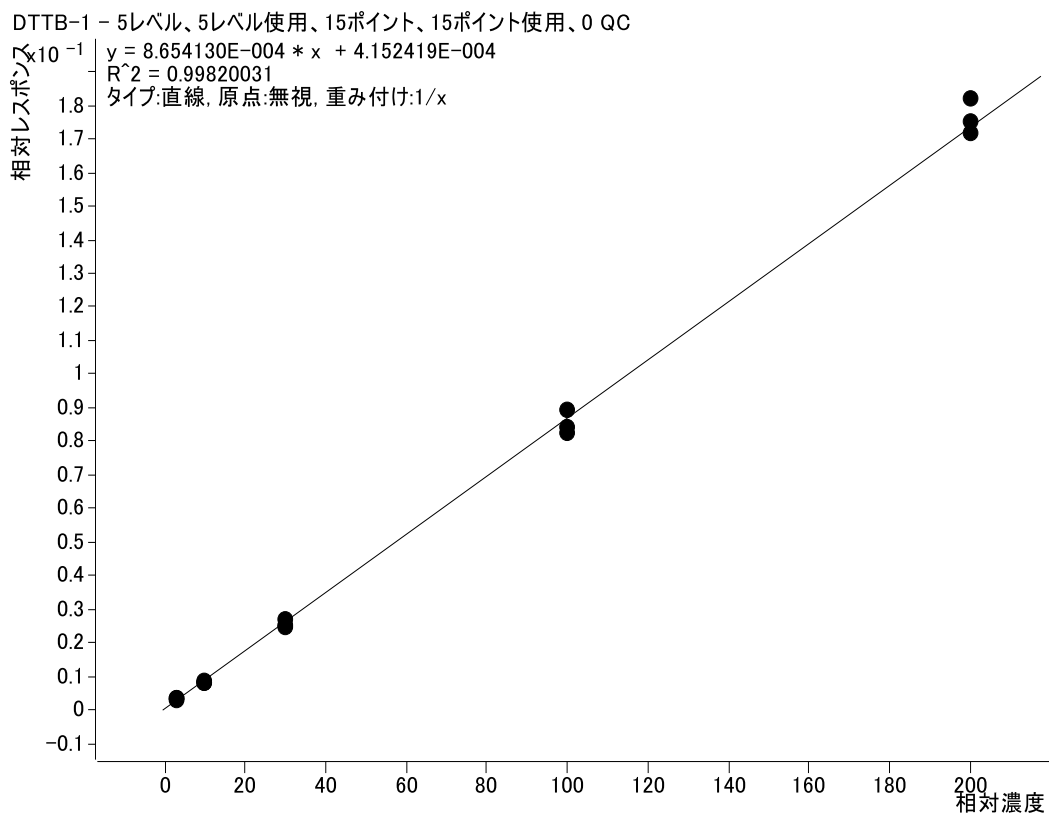


図 13 水素キャリアガス-GC/MS における DTTB の検量線(0.003-0.2 μg/L)

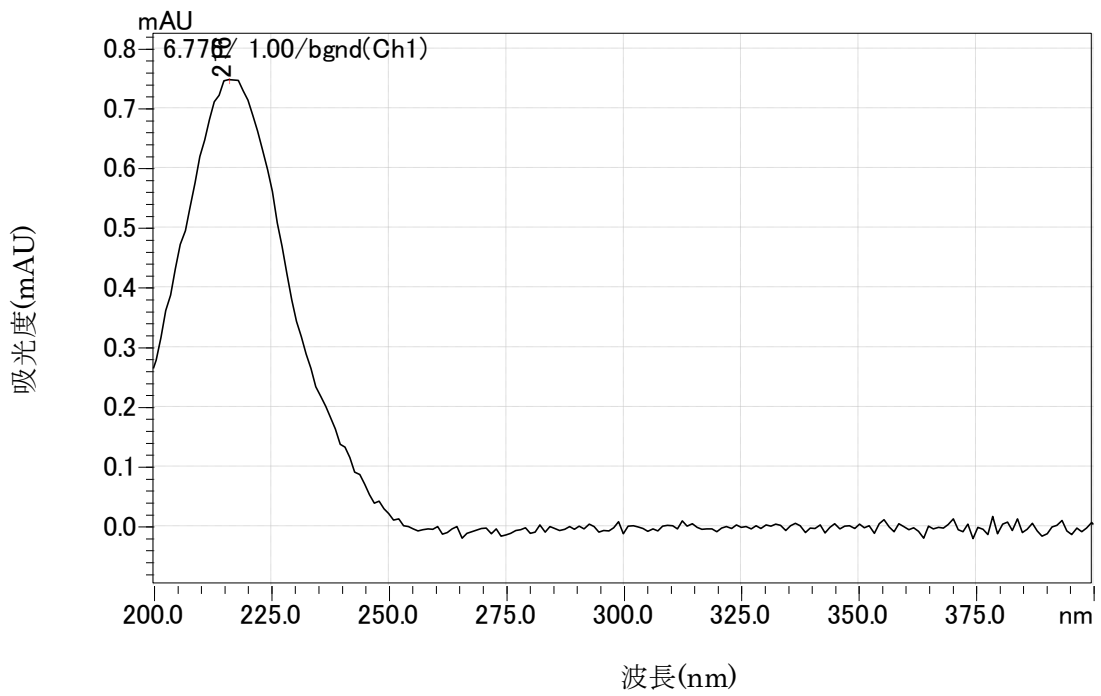


図 14 ディルドリンの UV スペクトル

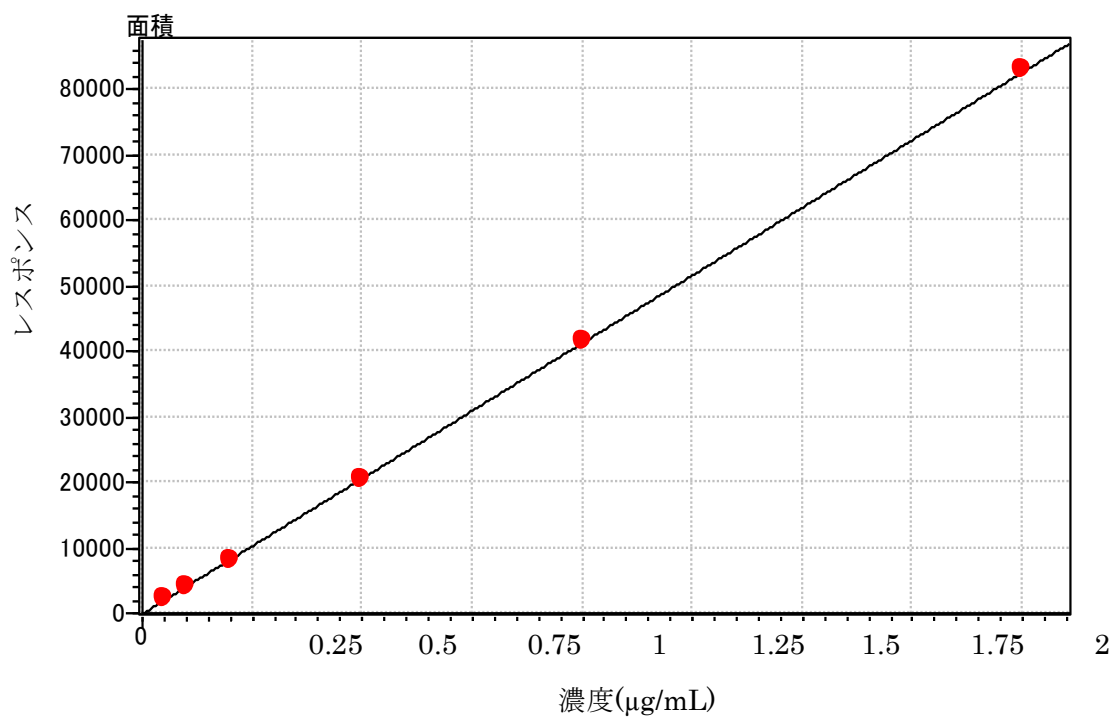


図 15 HPLC/PDA におけるディルドリンの検量線(0.05-2 µg/mL)

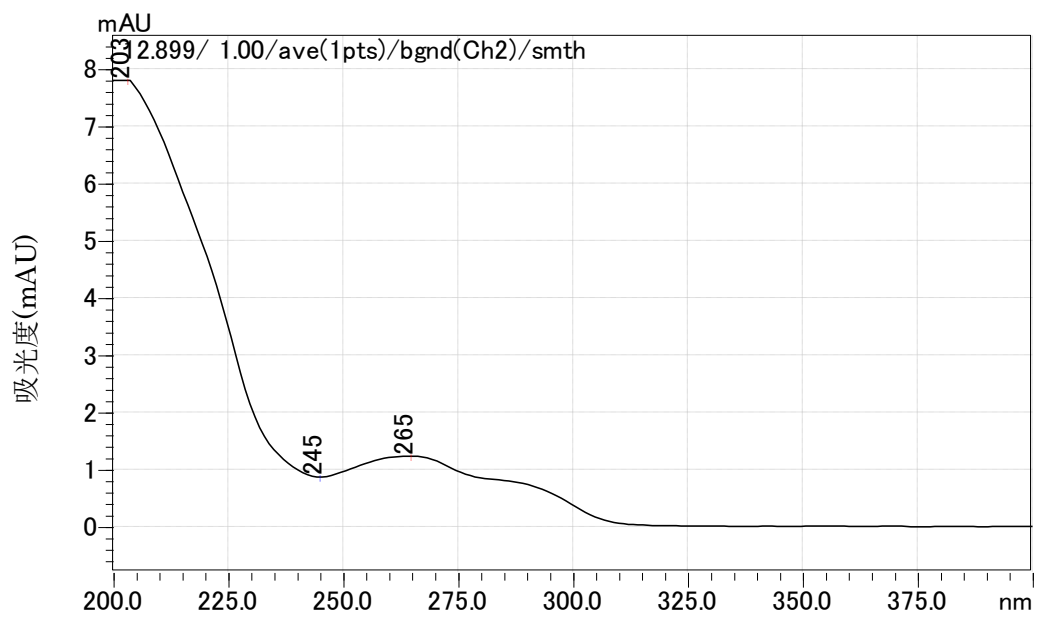


図 16 DTTB の UV スペクトル

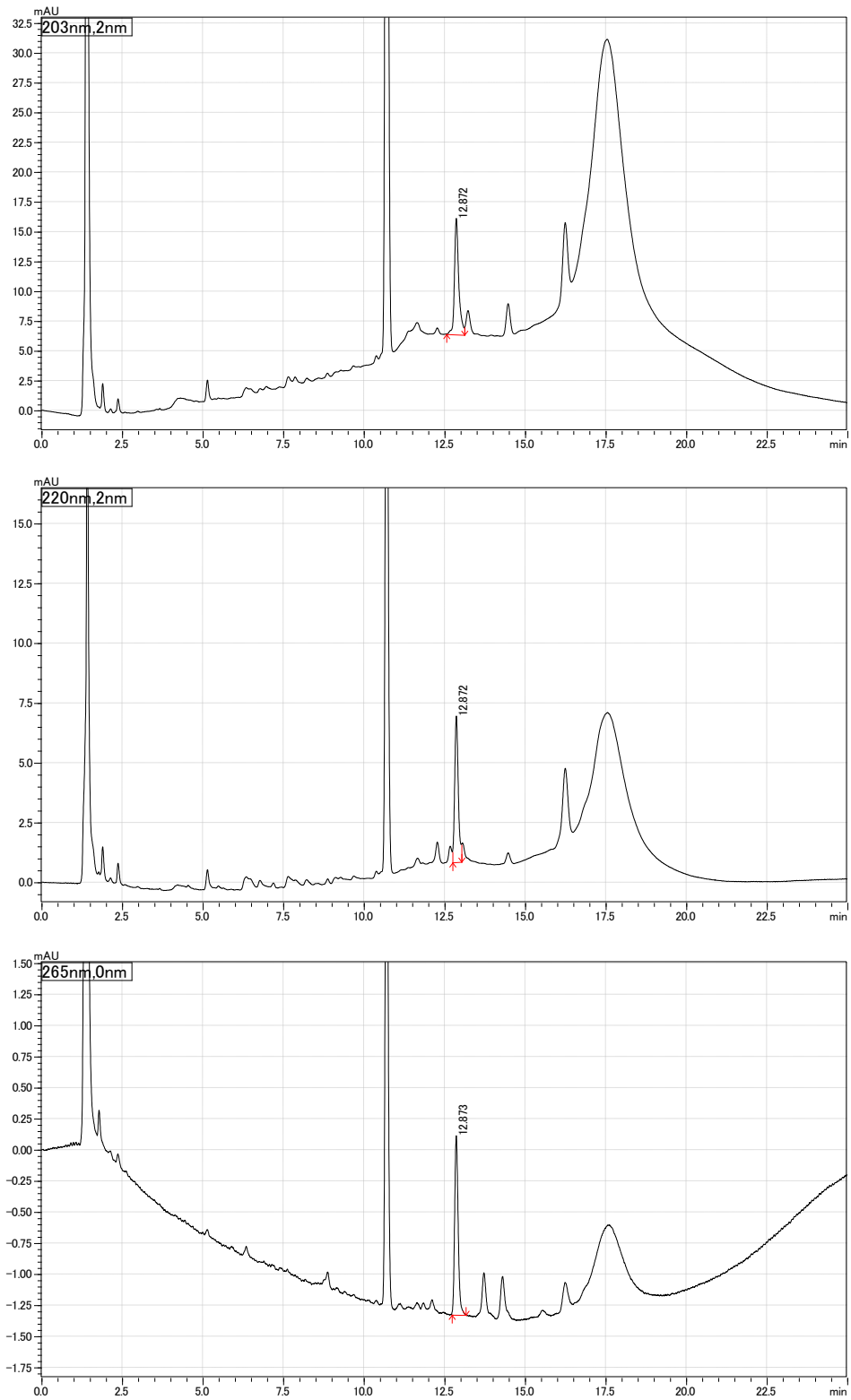


図 17 測定波長ごとの DTTB のクロマトグラムの比較  
 (上 : 波長 203 nm、中 : 波長 220 nm、下 : 波長 265 nm)

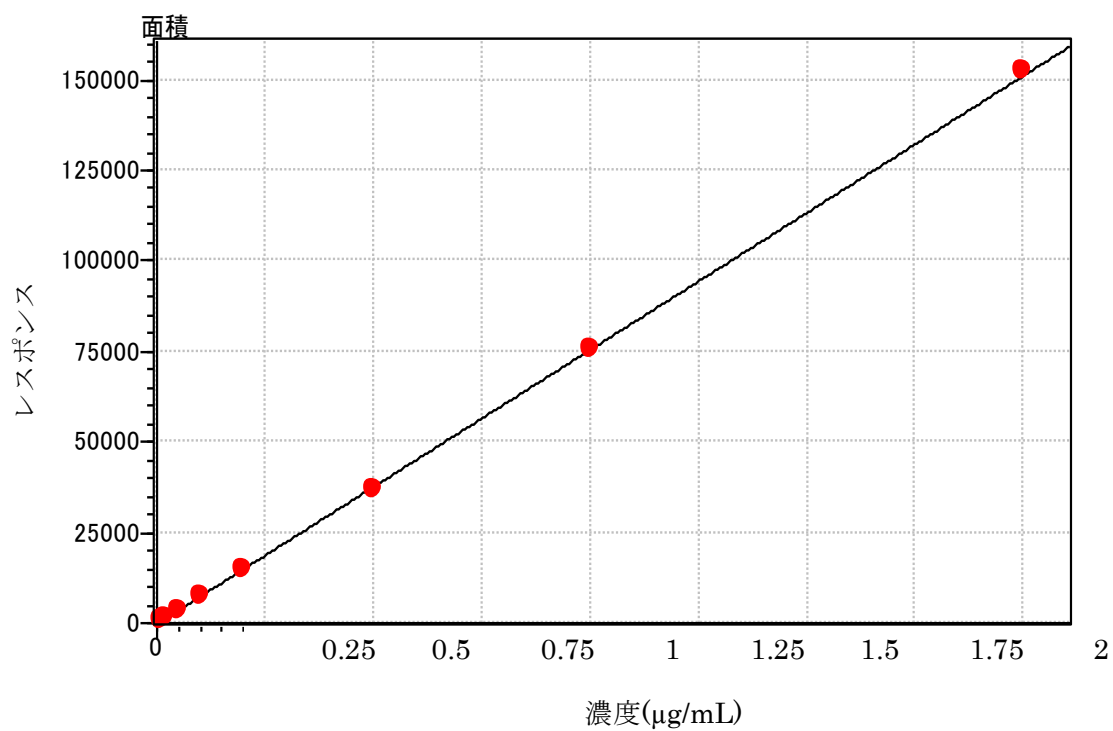


図 18 HPLC/PDA における DTTB の検量線(0.01-2 µg/mL)



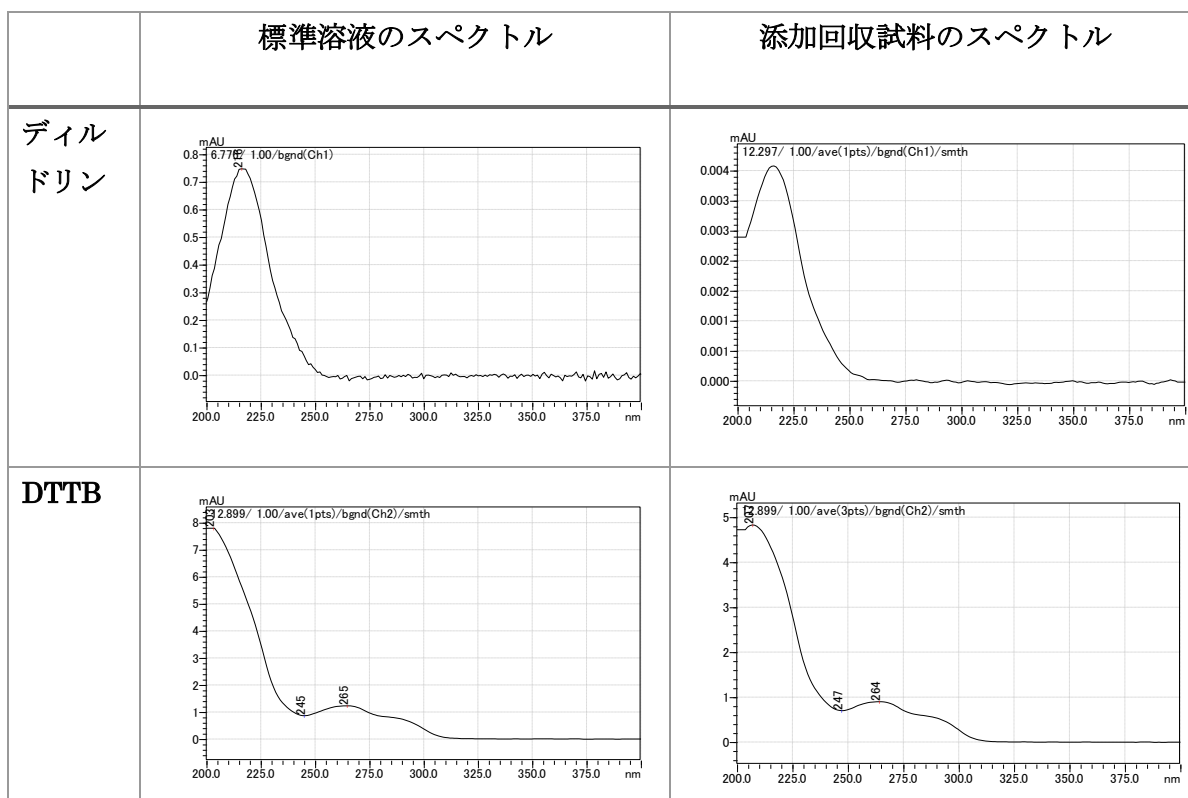


図 19 標準溶液と添加回収試料におけるスペクトルの比較

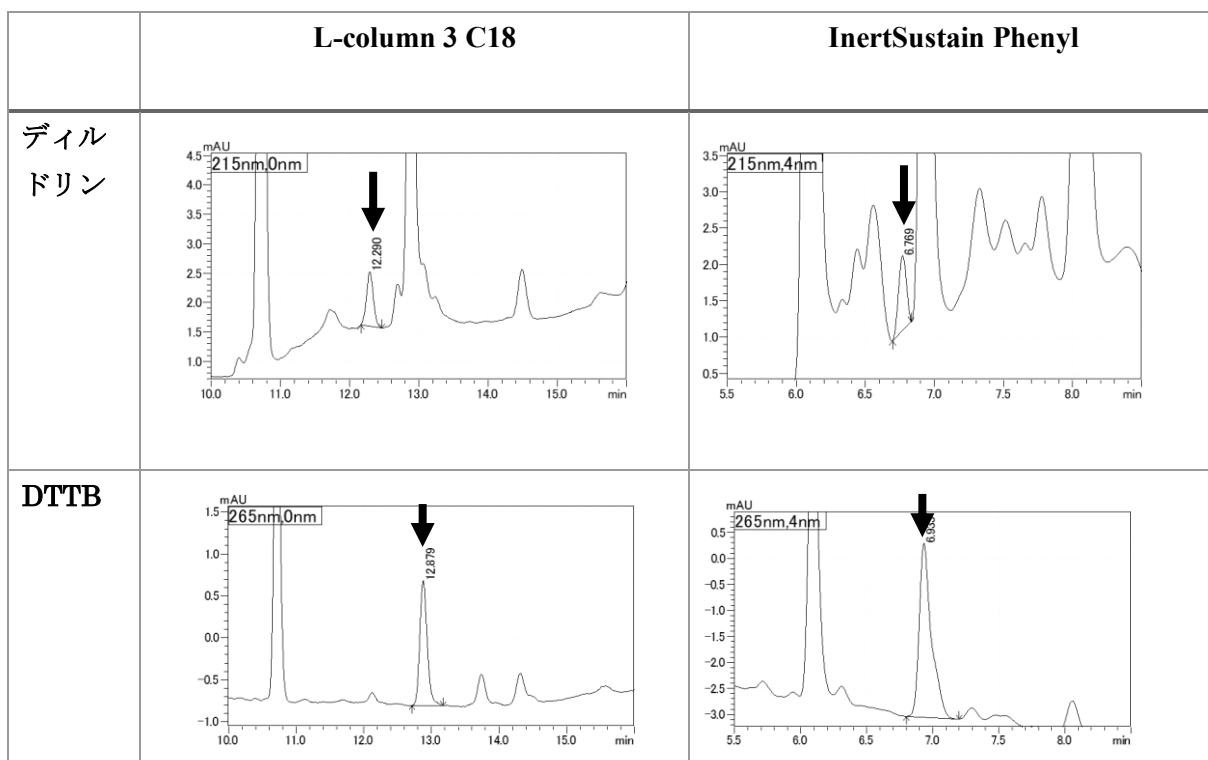


図 20 異なるカラムにおける添加回収試料のクロマトグラムの比較 (いずれも 30  $\mu\text{g/g}$ )