

令和 4 年度 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)

分担研究報告書

飲料水中の有機リン化合物および非意図的変化体の分析法の開発

研究分担者 王 齊 静岡県立大学 特任助教

研究要旨：

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、その水中から水道水と比較して高い濃度の有機リン化合物が検出されたことが報告されている。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的変化体を生成し、毒性が向上する場合もある。

本研究では、飲料水に含まれる有機リン化合物の分析方法の精緻化および汚染実態調査を行う。また、非意図的変化体についても測定・毒性試験（アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価）を行う。以上により、多様化する飲料水中の有機リン化合物に対し、優先的に取り組みを進めるべき物質や広く事業者がリスク低減に取り組めるような提案を行うことを目的とする。

本分担課題では、飲料水中濃度レベルにおける有機リン化合物の一斉分析法の開発を行い、非意図的変化体の分析法についても開発した。

A. 研究目的

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている¹。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、参照用量は下回るものの、その水中から $170,000 \text{ ng L}^{-1}$ を超える濃度（水道水： $0.1\text{--}100 \text{ ng L}^{-1}$ ）の有機リン化合物

が検出されることが報告されている¹。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている²。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的変化体を生成し、毒性が向上する場合もある³。

本分担課題では、飲料水に含まれる有機リン化合物および非意図的変化体の分析方法

の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

B.1. 有機リン化合物の分析法の開発

B.1.1. 使用器具・試薬

Trimethyl phosphate (TMP), triethyl phosphate (TEP), tributyl phosphate (TBP), tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP), tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), tris(butoxyethyl) phosphate (TBOEP), tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP), triphenyl phosphate (TPhP), cresyl diphenyl phosphate (CsDPhP), tricresyl phosphate (TCsP), 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPHP) は東京化成工業(東京都)から購入した。Triphenyl phosphine oxide (TPhPO), tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP), tripropyl phosphate (TPP) は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。6-Benzylbenzo[c][2,1] benzoxaphosphinine 6-oxide (BzIDOPO) は三光株式会社(大阪府)より購入した。Naphthalen-2-yl diphenyl phosphate (NDPhP) はBiosynth AG(スイス)より購入した。5-Ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl) methyl methyl methylphosphonate (PMMMP) と bis[(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl] methylphosphonate (BPMMP) はMatrix Scientific (USA) より購入した。2,2-Bis(chloromethyl)-propane-1,3-diyltetrakis(2-chloroethyl) bisphosphate (V6) は Toronto Research Chemicals (カナダ) より購入した。TBP-*d*₂₇, TCEP-*d*₁₂, TPhP-*d*₁₅, TCsP-*d*₂₁, TEHP-*d*₅₁ は林純薬工業株式会社(大阪府)から購入した。

アセトニトリルはシグマアルドリッチジャパン合同会社(東京都)から購入した。アセトン, トルエン, ヘキサン, 酢酸エチルは

富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。すべての実験で, Milli-Q水(Merck Millipore社)を使用した。

B.1.2. 分析方法

水サンプル100 mLと酢酸エチル:ヘキサン(1:1, v/v) 100 mL, クリーンアップスパイク(*d*体mix4種: TPhP-*d*₁₅, TEHP-*d*₅₁, TCsP-*d*₂₁, TCEP-*d*₁₂)を分液漏斗に加え, 振とう機で30分間振とうした。有機層をナスフラスコに移し, エバポレーターでおよそ1 mLまで濃縮した。窒素パージで約80 μLまで濃縮した後, アセトニトリルで溶媒置換し, シリンジスパイクとしてTBP-*d*₂₇を20 μL加え, 最終液量を100 μLとした。有機リン化合物の分析には, 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS: TSQ Endura Thermo Fisher Scientific)を使用して測定した。イオン化法には大気圧化学イオン化(APCI)法およびエレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いた。LC-MS/MSの分析条件と分析対象物質ごとのトランジションのパラメーターをTable 1とTable 2に示す。

B.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro*試験および*in silico*評価により優先順位の高かったリン系化合物の非意図的変化体について, 分析法の開発を行った。研究方法については, 「有機リン化合物の汚染実態調査」における「有機リン化合物の一斉分析法の開発」と同様である。

C. 研究結果および考察

C.1. 有機リン化合物の分析法の開発

C.1.1. 有機リン化合物の一斉分析法の妥当性の検証

本研究で用いる分析法が, 本研究の目的を達成するために必要な精度を有しているか

確認するため、農林水産省の「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」⁴を基に分析法の妥当性の検証を行った。

19種類の有機リン化合物の混合標準溶液 (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng mL⁻¹) を用いて検量線を作成した (Figure 1)。これらの濃度範囲内にてLC-MS/MSのレスポンスと濃度が比例関係にあることを確認した (決定係数 (R^2) >0.99)。

本研究で対象とした有機リン系化合物物質の混合標準溶液を分析し、得られたエリアから、 S/N (signal-to-noise) 比 = 10となる濃度を定量下限値 (LOQ) とした。有機リン化合物のLOQをTable 3に示す。

ヘキサン洗浄したMilli-Q水を用いて有機リン化合物の添加回収試験を行った。各有機リン化合物の添加濃度は5 ppbである。実験結果をTable 4に示す。既往研究にて飲料水中から検出される主要な有機リン化合物 (例えばCsDPhPやEHDPPhP, TCEP, TPhPなど) の回収率は「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」⁴で許容される範囲内 (40%–120%) であった。ただし、TDCPPについては、135%であったため、今後、検討を進める。

有機リン化合物の汚染実態調査に用いた水サンプルに添加したクリーンアップスパイクの回収率は、全てのサンプルで良好であった (Table 5)。

C.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro*評価および*in silico*評価により得られた優先順位の高い変化体のなかから、有機リン化合物の汚染実態調査の結果も考慮して、TCEP, TDCPP, TEHPの非意図的変化体 (BCEP, BDCPP, BEHP) に対して、標準試薬を入手し、LC-MS/MS (イオン化法: ESI) を用いて分析方法の開発を行った。測定条件をTable 6に示す。また、今回の測定で得られ

たクロマトグラムをFigure 2に示す。それぞれの非意図的変化体で良好なピーク形状が得られた。

D. 結論

飲料水中の有機リン系化合物の測定法を19種類の有機リン化合物を対象に開発した。開発した分析法は、飲料水中の有機リン化合物を測定するのに十分な感度を有することが示唆された。また、主要と考えられる有機リン系化合物の非意図的変化体についても分析法を開発した。

E. 参考文献

1. Hou, M.; Shi, Y.; Na, G.; Zhao, Z.; Cai, Y. Increased Human Exposure to Organophosphate Esters via Ingestion of Drinking Water from Water Dispensers: Sources, Influencing Factors, and Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology Letters* **2021**. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00592.
2. 日本紫外線水処理技術協会, 一. ニュースレター No.13. 2021. <http://www.juva.jp/pdf/newsletterNo13.pdf>.
3. Yao, C.; Yang, H.; Li, Y. A review on organophosphate flame retardants in the environment: Occurrence, accumulation, metabolism and toxicity. *Science of The Total Environment* **2021**, 795, 148837. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148837>.
4. 農林水産省. 分析法の妥当性確認に関するガイドライン. 2019. https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide_validation.pdf

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

なし

G.2. 学会発表

- 1) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 野呂 和嗣, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの飲料水の摂取に伴う有機リン化合物のリスク評価に向けた分析法の検討, 第57回日本水環境学会年会, 愛媛. (2023年3月)
- 2) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 3) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 4) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ウォーターサーバーの飲料水中に含まれる有機リン化合物の実態調査, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 5) Maho Ishida, Mana Oishi, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Car Seat through Actual Clothing, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 6) Yuichi Miyake, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Occurrence of Novel Phosphorus-based Flame Retardants in Indoor Dust Collected from Japanese Dwellings, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 7) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 8) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 9) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 10) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品中リン系難燃剤の連続曝露と断続曝露における経皮曝露量への影響の比較, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 11) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の分析法の検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 12) 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討,

第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)

G.3. 市民向け説明会

- 1) 車内部材由来物質の車内環境への影響とその評価方法, 2022年9月6日(火), Web, 約30名, 技術情報協会, プレゼンター及び講習会の受講者
- 2) 環境サマースクール2022 「環境浄化と食品,化粧品との意外な関係」, 2022年8月5日(金), 静岡, 約40名, 静岡県立大学, 教員及びサマースクールの受講者(高校生)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1. 特許取得

なし

H.2. 実用新案登録

なし

H.3. その他(受賞)

- 1) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定 (2022年12月)
- 2) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価 (2022年12月)
- 3) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築 (2022年9月)
- 4) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定 (2022年9月)
- 5) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価 (2022年9月)
- 6) 第30回 環境化学討論会 Transtech賞, 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討 (2022年6月)

Table 1 LC-MS/MS 分析条件

HPLC		
Instrument	Ultimate 3000 LC Systems (Thermo Scientific)	
Column	Accucore Vanquish C18 (100 mm × φ2.1 mm, 1.5 μm)	
Mobile	Solvent A: water Solvent B: 20% acetonitrile/methanol	
Flow rate	0.3 mL min ⁻¹	
Column oven temperature	50°C	
Injection volume	2 μL	
Gradient	0~0.5 min	A:95%, B:5%
	~7.0 min	B:100%
	~15 min	B:100%
	~15.1 min	A:95%, B:5%
	~17 min	A:95%, B:5%
MS/MS		
Instrument	TSQ Endura (Thermo Scientific)	
Ionization mode	APCI & ESI	
Polarity	APCI (+) for PFRs	ESI (-) for Bis-PFRs
Positive ion discharge current	4 μA	4 μA
Negative ion discharge current	4 μA	4 μA
Seath gas (Arbitrary unit)	25	25
Aux gas (Arbitrary unit)	5	5
Sweep gas (Arbitrary unit)	0	0
Ion transfer tube temp	250°C	250°C
Vaporizer temp	300°C	300°C

Table 2 有機リン系化合物のLC-MS/MSの分析条件 (イオン化法: APCI)

Compound	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
TMP	1	4	Positive	141.025	79.217	23	69
	1	4	Positive	141.025	109.086	18	69
TEP	3	7	Positive	183.102	81.129	39	73
	3	7	Positive	183.102	99.114	20	73
TPP	5	8	Positive	225.12	81.191	46	74
	5	8	Positive	225.12	99.116	20	74
TBP	6	9	Positive	267.175	81.155	53	76
	6	9	Positive	267.175	99.088	19	76
TPhPO	5	8	Positive	279.11	77.214	48	148
	5	8	Positive	279.11	201.036	28	148
TCEP	4.5	7	Positive	286.953	81.123	57	97
	4.5	7	Positive	286.953	99.089	26	97
	4.5	7	Positive	286.953	125.06	19	97
TCPP	5	8	Positive	327.002	81.142	59	97
	5	8	Positive	327.002	81.142	59	97
	5	8	Positive	327.002	99.119	25	97
TPhP	6	9	Positive	327.14	215.205	28	166
	6	9	Positive	327.14	250.98	28	166
CsDPhP	6	9	Positive	341.076	152.084	39	114
	6	9	Positive	341.076	229.033	29	114
EHDPPhP	7	10	Positive	363.15	77.226	45	88
	7	10	Positive	363.15	251.019	12	88
TCsP	6.5	9.5	Positive	369.12	165.074	44	142
	6.5	9.5	Positive	369.12	243.028	30	142
TBOEP	6	9	Positive	399.225	57.304	25	141
	6	9	Positive	399.225	99.094	30	141
	6	9	Positive	399.225	143.052	21	141
TDCPP	6	8.5	Positive	430.875	75.113	46	109
	6	8.5	Positive	430.875	77.237	44	109

	6	8.5	Positive	430.875	81.153	51	109
	6	8.5	Positive	430.875	99.101	28	109
TEHP	8.5	11.5	Positive	435.327	71.186	22	116
	8.5	11.5	Positive	435.327	81.145	58	116
	8.5	11.5	Positive	435.327	99.107	19	116
NDPhP	6	9	Positive	377.211	127.058	42	140
	6	9	Positive	377.211	202	34	140
	6	9	Positive	377.211	203.032	25	140
BzIDOPO	5	8	Positive	306.971	91.169	31	126
	5	8	Positive	306.971	198.946	25	126
	5	8	Positive	306.971	214.946	24	126
BPMMP	3	6	Positive	449.151	97.097	44	157
	3	6	Positive	449.151	177.058	25	157
	3	6	Positive	449.151	273	20	157
PMMMP	2.5	5.5	Positive	287.031	97.111	26	116
	2.5	5.5	Positive	287.031	135	23	116
	2.5	5.5	Positive	287.031	177	16	116
V6	5.5	8.5	Positive	583.774	359.817	17	164
	5.5	8.5	Positive	583.774	361.817	18	164
TEHP- <i>d</i> ₅₁	8.5	11.5	Positive	486.654	102.146	22	108
	8.5	11.5	Positive	486.654	103.134	18	108
	8.5	11.5	Positive	486.654	82.28	24	144
TCsP- <i>d</i> ₂₁	6.5	9.5	Positive	390.225	173.1	45	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	175.137	36	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	254.199	35	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	255.114	33	138
TPhP- <i>d</i> ₁₅	6	9	Positive	342.151	82.25	43	109
	6	9	Positive	342.151	159.108	44	109
	6	9	Positive	342.151	160.138	44	109
TBP- <i>d</i> ₂₇	6	9	Positive	294.325	82.151	59	94
	6	9	Positive	294.325	83.173	59	94

	6	9	Positive	294.325	102.099	22	94
TCEP- <i>d</i> ₁₂	4.5	7	Positive	299.001	67.275	27	108
	4.5	7	Positive	299.001	69.621	27	108
	4.5	7	Positive	299.001	102.103	28	108
TCP- <i>d</i> ₁₈	5	8	Positive	345.151	102.04	23.298	153
	5	8	Positive	345.151	183	13.236	153

Table 3 有機リン化合物の定量下限値

PFRs	LOQ (ng mL ⁻¹)
TMP	0.53
TEP	0.071
TPP	0.044
TBP	0.069
TPhPO	0.051
TCEP	0.22
TCPP	0.16
TPhP	0.13
CsDPhP	0.11
EHDPhP	0.034
TCsP	0.032
TBOEP	0.49
TDCPP	0.59
TEHP	0.047
NDPhP	0.23
BzIDOPO	0.046
BPMMP	10
PMMMP	0.34
V6	1.3

Table 4 添加回収試験における回収率と相対標準偏差 (RSD)

	回収率 (%)	RSD (%)
BPMMP	ND	-
BzIDOPO	101	7.2
CsDPhP	107	11
EHDPhP	104	3.8
NDPhP	113	6.9
PMMMP	ND	-
TBOEP	ND	-
TBP	89	2.2
TCEP	117	2.7
TCPP	117	10
TCsP	106	4.5
TDCPP	135	15
TEHP	110	3.1
TEP	39	5.3
TMP	4	7.7
TPhP	120	7.6
TPhPO	107	2.9
TPP	67	0.68
V6	96	25

ND = not detected

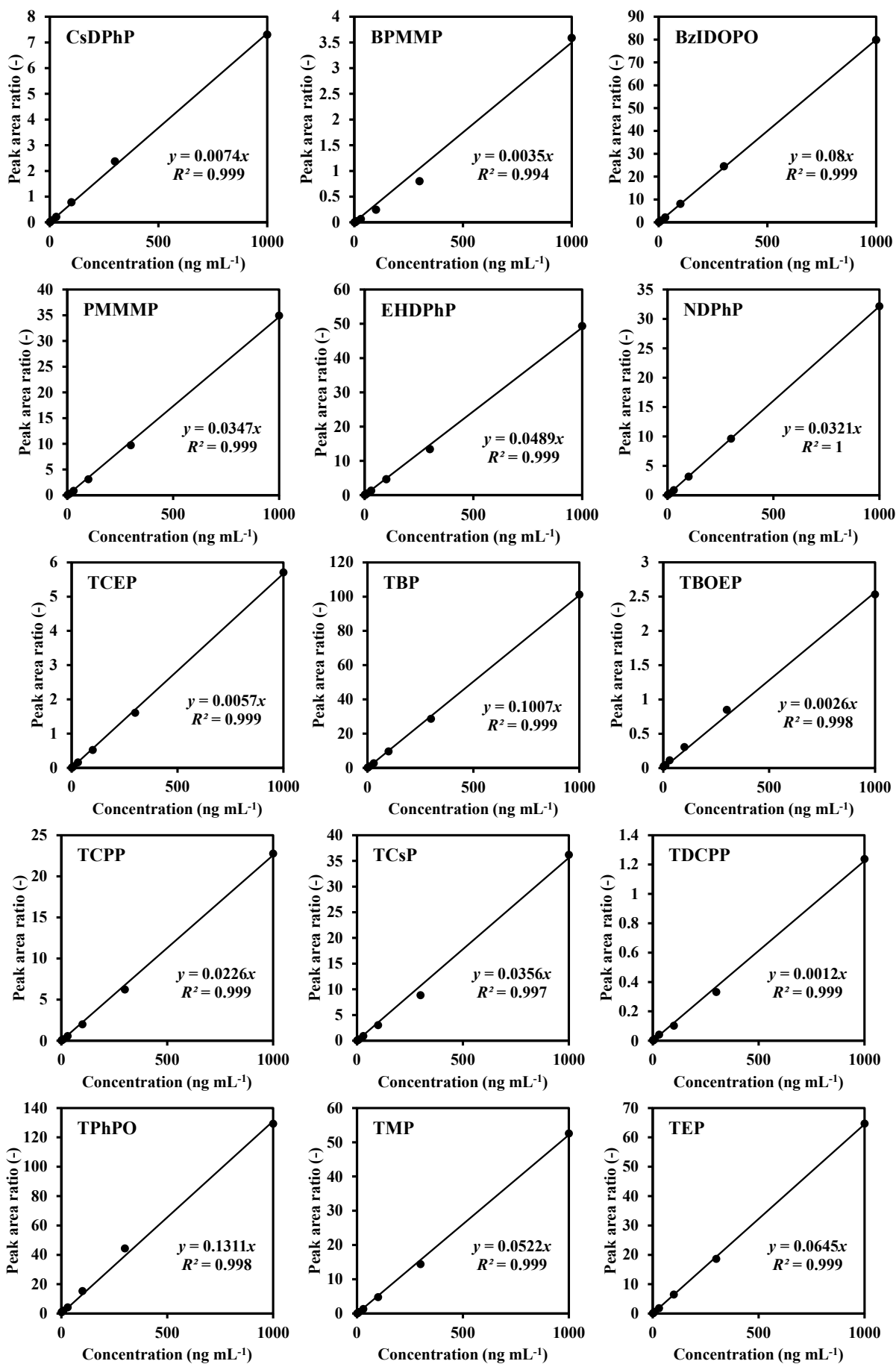
- = no data

Table 5 クリーンアップスパイクの回収率

	回収率 (%)	RSD (%)
TCEP- <i>d</i> ₁₂	73	11
TCsP- <i>d</i> ₂₁	86	9.5
TEHP- <i>d</i> ₅₁	86	11
TPhP- <i>d</i> ₁₅	86	15

Table 6 有機リン化合物の非意図的変化体のLC-MS/MSの分析条件 (イオン化法: ESI)

Compound	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
BCEP	1	5	Negative	221.891	37	10.253	75
	1	5	Negative	223.941	39	10.253	77
BDCPP	5	10	Negative	317.501	281.667	10.253	108
	5	10	Negative	317.501	283.595	10.253	107
BEHP	10	15	Negative	321.801	80.556	32.803	263
	10	15	Negative	321.801	210.071	20.82	263



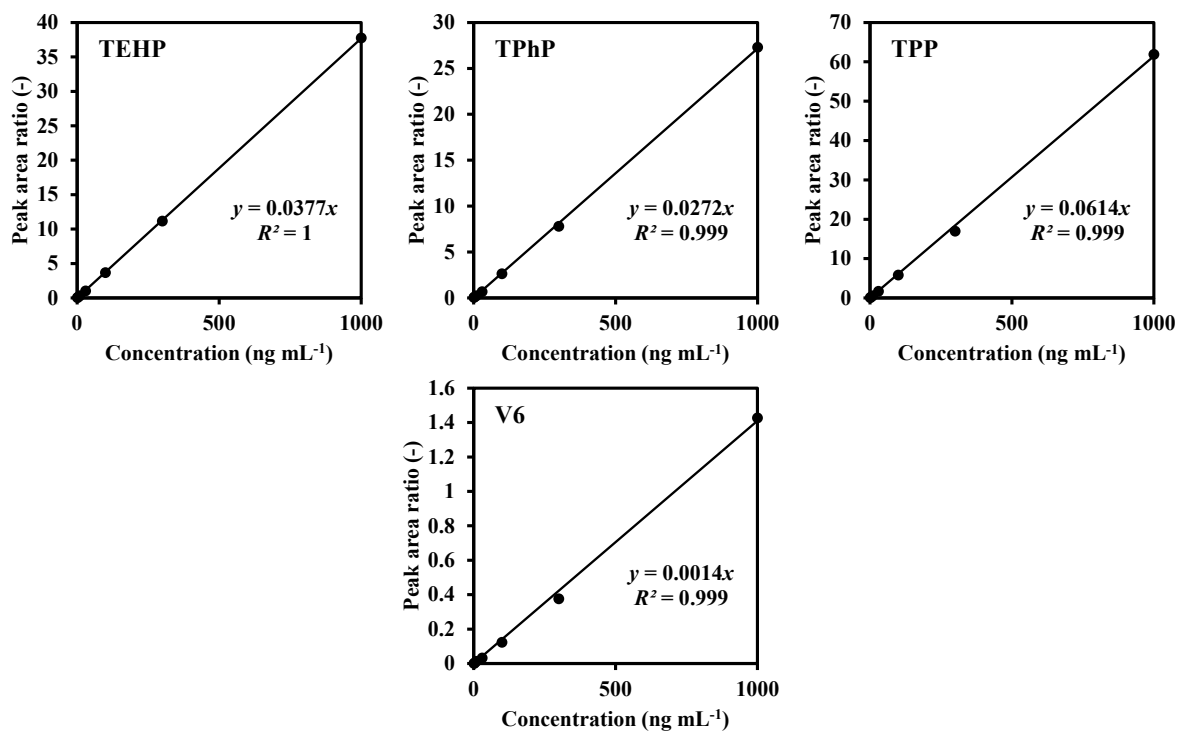


Figure 1 有機リン化合物の検量線

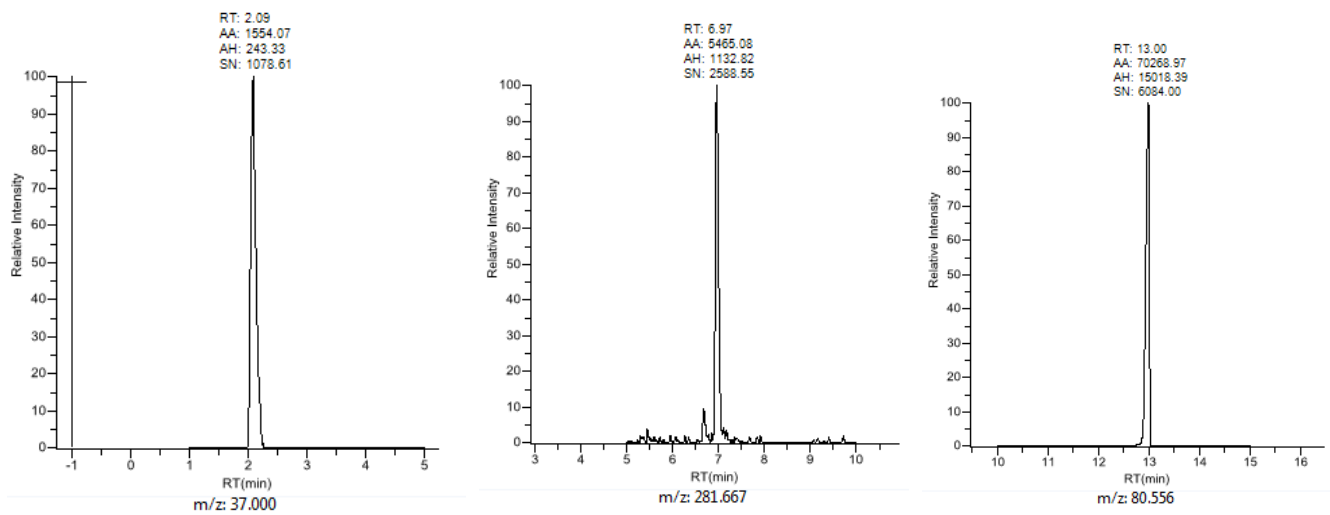


Figure 2 有機リン系化合物の非意図的変化体のクロマトグラム
(左 : BCP,中央 : BDCPP,右 : BEHP)