

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）

R4 年度終了報告書

家庭用品中の有害物質の規制基準に関する研究

家庭用品中の有機リン系防炎加工剤の試験法及びその実態に関する研究

研究分担者 大嶋智子、大阪健康安全基盤研究所、主任研究員

要旨

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律「（家庭用品規制法と略す）によって、有害物質として規制される有機リン系防炎加工剤のトリス（1-アジリジニル）ホスフィンオキシド（APO）の分析法について、本研究では汎用性の高い GC-MS の SIM による分析法を検討した。

今年度は、種々の防炎加工繊維製品について、メタノール還流抽出後、アセトン置換して精製する方法について添加回収試験を行い、データの蓄積を行った。その結果、前処理時間を短縮することができ、概ね良好な結果が得られた。しかし、綿 100% 防炎加工エプロンでは、アセトン置換で APO 及び APO-d₁₂ が不検出となり、精製することで検出される結果となった。これは、APO 及び APO-d₁₂ が試料中の種々の含有物質と何らかの結合をしたため GC-MS で不検出となったが、フロリジル精製により、APO 及び APO-d₁₂ 部分がフロリジルと強固に結合し、含有物質部分が精製過程で除去され、最終的にメタノールで APO 及び APO-d₁₂ が溶出され検出したと推察された。LC-MS/MS による検証を行ったところ、GC-MS 分析と同様の結果が再現された。これらより、防炎加工繊維製品中の APO 分析では、メタノール還流抽出後、アセトンに置換し、精製する必要があることがわかった。そうすることで、いずれの試料も APO-d₁₂ 補正回収率は良好で十分定量可能なことを確認した。また、APO-d₁₂ の回収率は試料により変動するが、GC-MS による低濃度分析が可能なことを考慮すると、内部標準補正及び絶対検量線法でもスクリーニング分析法として有用と考えられた。有害な溶剤を用いずに、分析者の健康に配慮した APO の GC-MS による微量分析法を開発した。

A. 研究目的

有機リン系防炎加工剤のトリス（1-アジリジニル）ホスフィンオキシド（APO）は

綿製品の耐久性防炎加工剤として昭和 40 年代に用いられてきた¹⁾が、有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律²⁾

(家庭用品規制法と略す)によって、有機リン系防炎加工剤の APO (図 1) に動物実験で経口・経皮毒性及び造血機能障害が確認されたことから、有害物質に指定され、寝衣、寝具、カーテン及び床敷物への使用が禁止された(昭和 53 年施行)。すでに 40 年以上経過した規制は、前処理に有害な溶剤ジクロロメタンを使用し、分析には充填カラムによる炎光光度検出器 (FPD) 付き GC 法が用いられており、分析技術や現在汎用性の高い GC-MS 等の機器のレベルに沿わなくなっていることが問題とされている状況にある。

そこで、選択イオンモニタリング (SIM) による GC/MS 分析法を検討した。まず、検量線は 0.01-2.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が得られ^{3,4)}、公定法の APO の検出限界 0.4 $\mu\text{g/g}$ 、定量限界 0.8 $\mu\text{g/g}$ ^{1,5)} を十分下回る 0.04 $\mu\text{g/g}$ の定量下限値が得られた。検出限界は S/N=5 で 0.008 $\mu\text{g/g}$ となり、公定法の検出限界の 1/50 も低値であった^{3,4)}。このことから低濃度分析が可能と考えられた。APO の公定分析法¹⁾は、昭和 53 年(1978 年)に施行されたもので、酸化アルミニウムカラムを用いた開放系での精製の際に、有害なジクロロメタンを使用しており、充填カラム GC-FPD で分析する状況にある。すでに 1997 年、石橋ら⁶⁾によるメガボアカラムによる GC-FPD 分析が報告された。その添加回収試験では、APO を 12.5 μg 添加し、有害な溶剤やサロゲート化合物 APO-d₁₂ を使用せずに、Sep-Pak フロリジルによる精製を行った結果、絶対検量線法で 77% の良好な回収率が得られた。また、味村ら⁷⁾の報告は、前処理はほぼ石橋ら⁶⁾と同じであるが、

APO-d₁₂ を使用していること、GC-MS (SIM) 分析を検討していることが刷新であった。しかし、綿 100% 製品 2 試料の添加回収試験において、サロゲート補正回収率は概ね良好であったが、内部標準補正回収率は 2 μg という微量添加で良好な結果は得られていない⁷⁾。このように低濃度分析のデータが少ないことから、APO について GC-MS の SIM による微量分析法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

B1. 試薬等

APO 及び APO-d₁₂ はトロントリサーチケミカル製を用いた。メタノール、*n*-ヘキサン、アセトン、エタノールは富士フィルム和光純薬製の残留農薬試験用を用いた。内部標準物質には、富士フィルム和光純薬製の環境分析用標準品アセナフテン-d₁₀ を用いた。精製には、Waters 製 Sep-Pak フロリジル Plus Long cartridge 910 mg, 50-200 μm (合成ケイ酸マグネシウムミニカートリッジカラム) を用いた。また、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による検証のため、超純水は富士フィルム和光純薬製の LC/MS 用を、酢酸アンモニウム (1 mol/L) はナカライテスク製の液体クロマトグラフィー用特製試薬を用いた。

B2. 試料

試料には APO が使用される可能性のある綿製品を主に選び、混紡品及び天然繊維を用いた防炎加工繊維製品 6 試料を用いた。無加工布に相当する試料には、綿 100% 乳幼児肌着および日本規格協会製、

染色堅ろう度試験用添付白布の綿 100 % (カナキン 3 号)、毛 100 %、絹 100%を用いた。

B3. 装置及び分析条件

GC-MS 装置は、Agilent 製 HP6890GC/HP5973 を用いた。カラムは、HP-5MS UI (30 m×0.25 mm×0.25 µm) を用いた。カラム昇温条件は、40°Cで2分間保持し、毎分 20°Cで 180°Cまで昇温し、さらに毎分 10°Cで 300°Cまで昇温後、10分間保持した。キャリアーガスにヘリウムガスを用い、1.0 mL/min で定流量モードにより分析した。注入口温度は、250°C、インターフェース温度 280°C、スプリットレス注入法で、1 µL を注入した。イオン源温度は 230°C、イオン化エネルギーは 70 eV であった。SIM 分析では、APO (131、90)、APO-d₁₂ (139、95)、アセナフテン-d₁₀ (164、162) を、定量/確認イオン (m/z) とした。

LC-MS/MS 装置は、エービーサイエックス社製の Triple Quad 4500 に Exion (LC 部) を装着したものを、カラム及び分析条件は、国際標準化機構 (ISO) に収載の繊維製品についての有機リン系防炎加工剤分析法⁸⁾ に準拠し、大気圧エレクトロスプレーイオン化法のポジティブモード (ESI+) により分析した。イオン化最適条件は、精密質量より得た。

B4. 標準溶液の調製

APO は約 2 mg を、APO-d₁₂ は 1 mg をそれぞれ正確に秤量し、メタノールを加え、10 mL とし、各標準原液を調製した。各標準原液をアセトンで希釈し、それぞ

れ 10 µg/mL の標準溶液を調製した。

検量線用には、APO 標準溶液 10 µg/mL を段階的にアセトンで希釈して調製した。各段階 (0.1–2.0 µg/mL) の標準溶液 1 mL 中に APO-d₁₂ が 0.2 µg 含有するように APO-d₁₂ 標準溶液 (10 µg/mL) を添加した。また、内部標準溶液は、アセナフテン-d₁₀ の 10 µg/mL をアセトンで調製した。各濃度の標準溶液をそれぞれ 1 mL 分取して、内部標準溶液 10 µL を加え、GC-MS 用混合標準溶液とした。また、添加回収用には、APO 及び APO-d₁₂ の各 50 µg/mL 混合標準溶液をメタノールで調製した。

B5. APO の試験溶液の調製

細切 (1×1 cm 程度) した試料を正確に 0.5 g 採取し、APO-d₁₂ の標準原液 (100 µg/mL) を 20 µL 添加した後、メタノール 25 mL を加え、70°C30分還流抽出を行った。抽出溶液をガラスフィルターでろ過したものを受器に取った。還流に使用した容器をメタノール 5 mL で2回洗浄し、洗液も先の受器に合わせた。抽出溶液をロータリーエバポレーター (EV) により 40°C以下で、5 mL まで濃縮した後、アセトン 5 mL を加え混合してから、さらに EV で 1 mL 程度に濃縮した。この操作を再度行い、アセトンで 10 mL に定容し試験溶液とした。試験溶液 1.0 mL を、予めエタノール、アセトン各 10 mL でコンディショニングした Sep-Pak フロリジルカートリッジカラムに負荷し、アセトン 5 mL で精製後、メタノール 10 mL で溶出させて受器に取った。EV で濃縮し、アセトン溶液に置換した後、定容容器に移し替え窒素ガス気流下で 0.3 mL まで濃縮してか

らアセトンで 1.0 mL に定容した。内部標準溶液を 10 μ L 加え、GC-MS 用試験溶液とした。

C. 結果及び考察

C1. 検量線、検出限界および定量下限値

APO のマスクロマトグラムは良好な分離を示した (図 2)。GC-MS の SIM 分析で、APO の検量線は 0.01-2 μ g/mL の範囲で、乖離度 $\pm 20\%$ 以内の良好な直線性が得られたので、その範囲で定量することにした。公定法の APO の検出限界 0.4 μ g/g、定量限界 0.8 μ g/g^{1,5)} の 1/20 に相当する 0.04 μ g/g の定量下限値が得られた。また、検出限界は S/N=5 で 0.008 μ g/g となり、公定法の検出限界の 1/50 の低値であった。

C2. 低濃度の添加回収試験

APO 分析法に関する報告^{6,7)}では、低濃度での情報が少ないことから、今回、GC-MS (SIM) による微量分析法を確立するために低濃度の添加回収試験を実施した。試料には種々の防災加工繊維製品 6 試料及び無加工布 4 試料を用い、いずれも 3 試行で検討した。

各々の試料に APO 2.0 μ g を添加し、5 分間風乾後、家庭用品規制法に従いメタノールで還流抽出した。既報^{6,7)}に従いヘキサン溶液に置換して、まず、精製前の GC-MS 分析を行った。その結果、図 3 に示すように、APO-d₁₂ 補正回収率は無加工布の綿 100% (乳幼児肌着) では 89.3%、毛 100% 素材では 97.2% と良好で、内部標準補正回収率、APO-d₁₂ の回収率はいずれも 66.8-74.4% と概ね良好であった。一方、防災加工繊維製品では

APO-d₁₂ 補正回収率が 98.7-115.9% と良好であっても、内部標準補正回収率、APO-d₁₂ の回収率は 24.2-45.4% と低く、綿 100% 防災加工エプロンに至っては、APO 及び APO-d₁₂ も不検出となった。水溶性の高い APO がヘキサンに溶解していない可能性や種々の防災加工剤や染料等による分析妨害が示唆されたことから、メタノール還流抽出後、アセトンに置換した。その結果、図 4 に示すように綿 100% 防災加工エプロン以外の試料で、APO-d₁₂ 補正回収率は良好であり、内部標準補正回収率、APO-d₁₂ の回収率は、いずれもヘキサンに置換するより改善がみられ、絶対検量線法による定量も製品によっては可能なことがわかった。しかし、綿 100% 防災加工エプロンについては、ヘキサン置換の場合と同様に、APO 及び APO-d₁₂ は不検出となった。また、綿 50% アクリル 50% の防災加工毛布でも、ヘキサン置換の場合と同様、APO-d₁₂ 補正回収率は良好であったが、内部標準補正回収率、APO-d₁₂ の回収率、絶対検量線法では、いずれも 20% 程度の回収率となり、改善は見られなかった。

C3. 精製について

アセトン置換した試験溶液を、Sep-Pak フロリジルカートリッジカラムを用いて精製した。既報^{6,7)}では、ヘキサン置換溶液から精製を行うが、アセトン置換することで前処理時間を短縮することができた。図 5 に示すように、アセトン置換して精製することで、APO-d₁₂ 補正回収率はどの試料も 73.5-126.6% となり十分

分析できることを確認した。内部標準補正回収率、APO-d₁₂の回収率及び絶対検量線法による回収率は、製品によるばらつきがみられるものの、多くの試料で34.4-68.3%の回収率を示した。一方、綿100%防災加工エプロンでは、それぞれ12.6%、15.1%、10.4% (RSD 3.5-19.8%) と低い回収率であった。綿100%防災加工エプロンについては、精製しない場合に不検出であったため(図3、4)、精製する必要があることがわかった(図5)。また、綿50%アクリル50%の防災加工毛布でも精製により回収率の改善がみられた。これらのことから、溶媒置換する際に、APO及びAPO-d₁₂が、試料中の含有物質と何らかの結合をしたため検出されなかったと考えられた。精製を行うことで、APO及びAPO-d₁₂部分がフロリジルと強固に結びつき、精製過程で含有物質部分が除去され、最終溶離液のメタノールでAPOが溶離し検出されたと推察される。このように防災加工繊維製品の中には綿100%防災加工エプロンのように十分な回収率が得られないものもあるが、現行の定量限界の1/20まで定量可能なことから、アセトン置換して精製することで、いずれの方法においても規制対象物質のAPOを見逃すことがないため、スクリーニング分析法として有用と推察された。

なお、毛100%素材はAPO-d₁₂の保持時間付近に妨害ピークがみられたが、定量/確認イオンの存在比から同定や定量が可能であった。毛100%及び綿100%素材は、アセトン置換した際に、別の規制対象防災加工剤(TDBPP)の重水素化体

付近にコレステロール及び植物ステロール由来の妨害ピークがみられたが、精製により、いずれの妨害物質も除去できることが確認された。

C4. LC-MS/MSによる検証

綿100%防災エプロンについて、精製によるAPOの挙動について、C3にて推察したことをLC-MS/MSを用いて検証することにした。精製前後の試験溶液の一部をLC-MS/MSを用いて分析した⁸⁾。選択反応モニタリング(SRM)の最適分析条件は、各標準溶液0.1 µg/mLのメタノール溶液をMS部に直接導入し、精密質量より求めた。APOのプレカーサーイオン(Q1) > プロダクトイオン(Q3)は、174.0 > 131.0 (定量)、174.0 > 89.9 (確認)、APO-d₁₂は185.8 > 139.2 (定量)、185.8 > 95.0 (確認)が得られた。図6にAPO標準溶液0.02 µg/mL (0.016 µg/mLのAPO-d₁₂含有)についてLC-MS/MS分析におけるSRMクロマトグラムを示した。綿100%防災エプロンに関しては、精製前後のいずれも定容した試験溶液をそれぞれアセトニトリルで約10倍に希釈し、フィルター過したものをLC-MS/MSで測定した。図7には、APO定量イオン174.0 (Q1) > 131.0 (Q3)のSRMクロマトグラムのみを示した。図7に示すように綿100%防災加工エプロンは、アセトン置換した場合にAPOは不検出となり、精製後ではAPOが検出されることが確認された。APO-d₁₂もAPOと同様の挙動を示した(図示せず)。LC-MS/MSによる検証結果は、GC-MSの推察を裏付

けるものであった。

D. まとめ

有機リン系防炎加工剤 APO について、GC-MS 分析法を検討した。その結果、公定法の APO の検出限界 0.4 µg/g、定量限界 0.8 µg/g^{1,5)} を一桁以上下回る 0.04 µg/g の定量下限値及び 0.008 µg/g の検出限界が得られ、微量分析が可能であった。

防炎加工繊維製品の APO 分析では、メタノール還流抽出後、ヘキサン置換^{6,7)}からアセトン置換へ変更することで前処理時間を短縮することができた。GC-MS を用いた APO の微量分析法を検討した結果、アセトン置換後、精製することで、妨害物質の影響を省くことができ、いずれの試料も APO-d₁₂ 補正回収率は良好で十分定量可能なことを確認した。また、APO-d₁₂ の回収率は試料により変動するが、GC-MS による低濃度分析が可能なることを考慮すると、内部標準補正及び絶対検量線法でもスクリーニング分析法として有用と考えられた。有害な溶剤を用いずに分析者の健康に配慮した APO の GC-MS 微量分析法を開発した。

今回、LC-MS/MS 分析を GC-MS 分析の検証に利用したが、ヘリウムガスに頼らない分析法として、LC-MS/MS 分析法の有用性が示唆された。

E. 研究発表

E1. 論文発表

なし

E.2 学会発表

- 1) 大嶋智子・角谷直哉・河上強志：家庭用品規制法における防炎加工剤の試験法の検討 (V)、第 59 回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.10.31-11.1) 川崎市
- 2) 高木総吉, 吉田仁, 大嶋智子, 山口進康：防水加工スプレー剤中 PFAS の分析法検討と実態調査, 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.10.31-11.1) 川崎市

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 引用文献

- 1) 保健衛生安全基準家庭用品規制関係実務便覧 (加除式製本), 技術編, 2045 の 2-2045 の 14, 第一法規出版, 昭和 50 年
- 2) 厚生省令第 34 号：有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則, 昭和 49 年 9 月 26 日
- 3) 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) 家庭用品中の有害物質の基準規制に関する研究、令和 2 年度 総括・研究報告書、令和 3 (2021) 年 5 月
- 4) 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) 家庭用品

- 中の有害物質の基準規制に関する研究、令和3年度 総括・研究報告書、令和4(2022)年5月
- 5) 森謙一郎, 西田茂一, 原田裕文: 家庭用品の衛生化学的研究(第2報) 防災加工布に含まれる Tris (1-aziridinyl) phosphine oxide (APO) の分析法, 東京都衛生研究所年報, 28-1, 74-78, 1977
- 6) 石橋正博, 真鍋静子, 篠原純子, 江口征夫, 城戸浩三: 繊維製品中の有機リン酸エステル系防災加工剤の一斉分析—有害な有機溶媒を用いない方法—, 北九州市衛生研究所報告 25, 56-57, 1997
- 7) 味村真弓, 中島晴信, 河上強志, 伊佐間和郎: 繊維製品に含まれるトリス(1-アジリジニル)ホスフィンオキシド(略称:APO)の分析法の改定に向けた検討, 大阪健康安全基盤研究所研究年報 1, 93-100 (2017)
- 8) ISO 17881-2:2016(E), Textiles—
Determination of certain flame retardants
—Part 2: Phosphorus flame retardants,
International Organization for
Standardization (ISO)

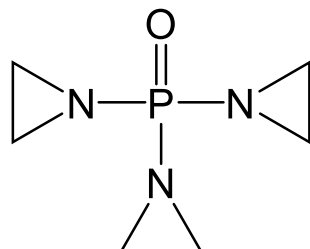


図1 トリス(1-アジリジニル)ホスフィンオキシド(APO)の構造式

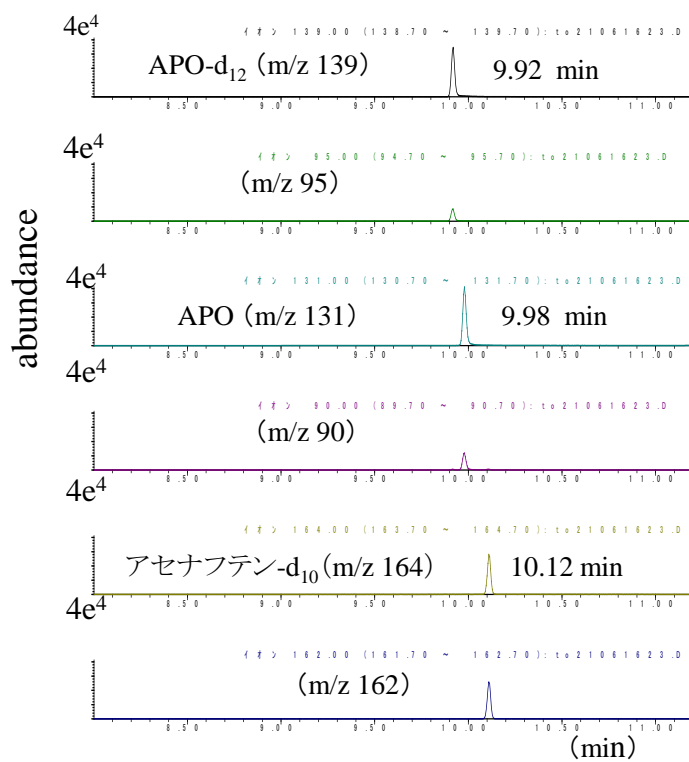


図2 APO、APO-d₁₂ 及びアセナフテン-d₁₀ のGC-MS クロマトグラム

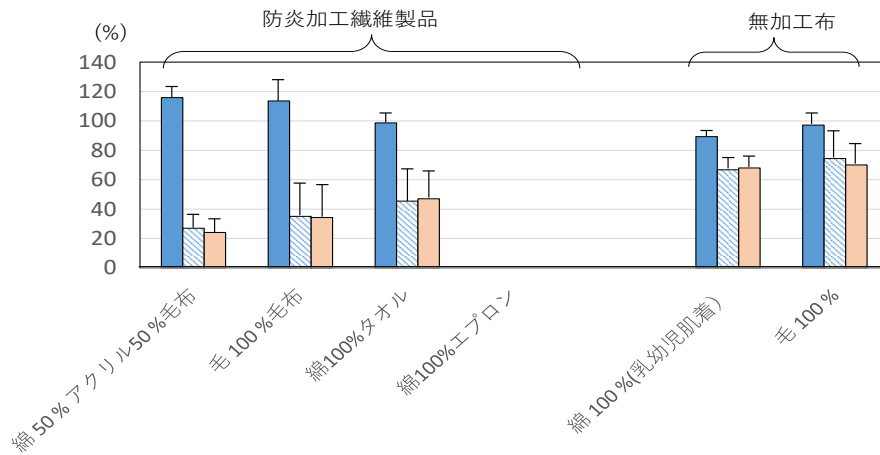


図3 メタノール還流抽出後、ヘキサンに置換した時のAPOの回収率

■ サロゲート補正 □ 内部標準補正 ■ APO-d12の回収率

添加回収試験は、試料にAPO及びAPO-d₁₂をいずれも2.0 µg添加。内部標準にアセナフテン-d₁₀を用い、試験溶液中0.1 µg/mLとなるよう添加。(n=3)

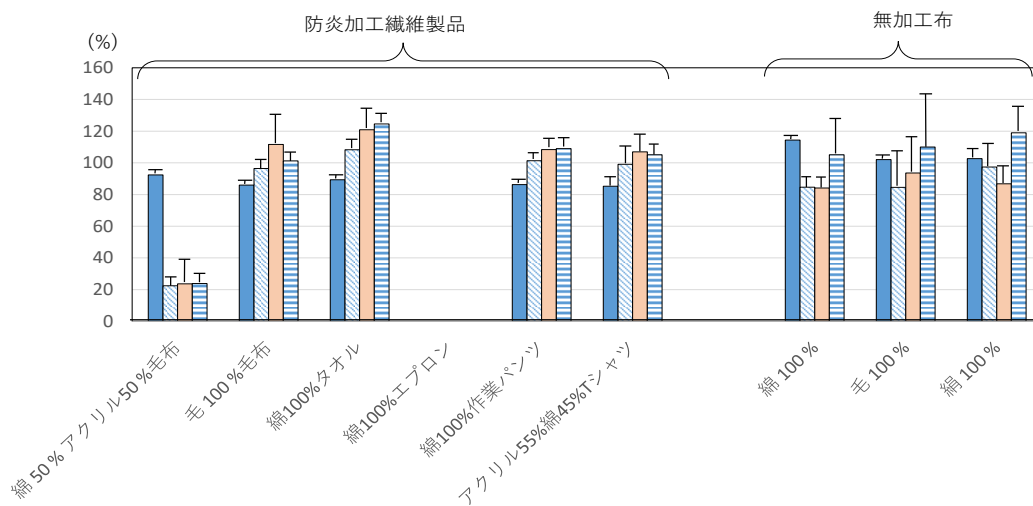


図4 メタノール還流抽出後、アセトンに置換した時のAPOの回収率

■ APO-d12補正 □ 内部標準補正 ■ APO-d12の回収率 ■ 絶対検量線法

添加回収試験は、試料にAPO及びAPO-d₁₂をいずれも2.0 µg添加。内部標準にアセナフテン-d₁₀を用い、試験溶液中0.1 µg/mLとなるよう添加。(n=3)

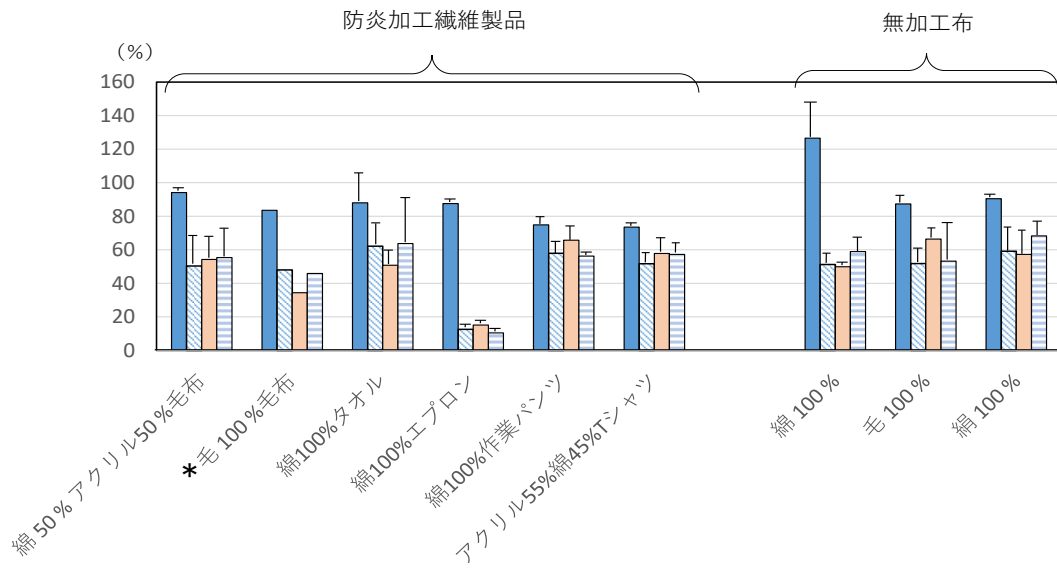


図5 メタノール還流抽出後、アセトン置換を行い、フロリジルによる精製をした時のAPOの回収率

■ APO-d12補正 □ 内部標準補正 ■ APO-d12の回収率 ▨ 絶対検量線法

添加回収試験は、試料にAPO及びAPO-d₁₂をいずれも2.0 μg添加。(n=3)

内部標準にアセナフテン-d₁₀を用い、試験溶液中 0.1 μg/mLとなるよう添加した。

* 毛100%毛布は、n=2の平均をグラフに示した。その各回収率(%)は、APO-d₁₂補正で82.9、84.1、内部標準補正で51.1、44.9、APO-d₁₂の回収率39.4、29.4、絶対検量線法で48.4、43.4であった。

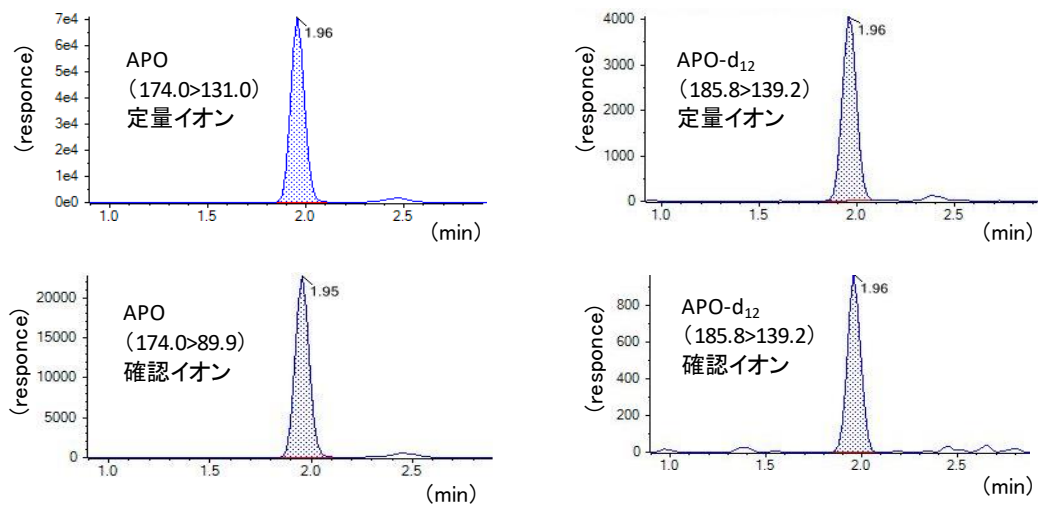


図6 APO標準溶液(0.02 µg/mL)及びAPO-d₁₂(0.016 µg/mL)のSRMクロマトグラム

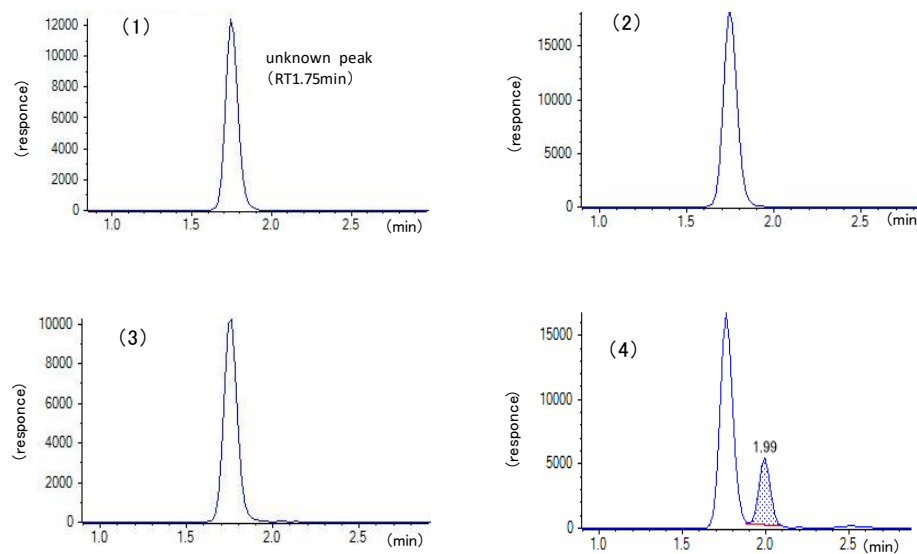


図7 綿100%防災加エエプロンについて精製前後のSRMクロマトグラム

(1)無添加-精製前、(2)APO添加-精製前、(3)無添加-精製後、(4)APO添加-精製後
 精製前試験溶液はアセトニトリルで10倍希釈して測定。精製後定容した試験溶液をアセトニトリルで10倍希釈して測定した。
 APOのプレカーサーイオン(Q1)>プロダクトイオン(Q3)、174.0>131.0(定量)についてのみ示した。
 RT1.75 minにunknown peakが検出され、白抜きで示した。APOは、RT1.96-1.99 minに検出され、網掛けで示した。