

短報

ヘリウムガス不足に対応した 繊維製品中防虫加工剤の分析法

西以和貴¹, 上村 仁¹, 河上強志²

Analytical method for mothproofing agents in textile products under conditions of insufficient helium gas supply.

Iwaki NISHI, Hitoshi UEMURA,
and Tsuyoshi KAWAKAMI

はじめに

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．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．

我々はこれまでの研究で，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¹⁾．この試験法はヘリウムガスを使用するガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）を用いるものであるが，昨今ヘリウムガス供給不足が問題となっていることから²⁾，その代替分析法が利用可能かを検討する必要がある．そこで本研究では，ディルドリン及びDTTB試験法において水素キャリアガス-GC/MSを代替分析法として検討した．また，水素キャリアガス-GC/MSは水素の安全性への懸念から導入が困難な機関があると想定されることから，更なる代替分析

法として，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）についても検討を行った．

方法

1. 試薬及び使用器具

ディルドリンはDr. Ehrenstorfer製，DTTBは富士フイ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-d₁₀はC/D/N isotopes製，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．メチル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．塩化ナトリウム，リン酸，リン酸水素二ナトリウム・2水和物は富士フイルム和光純薬製の特級を用いた．また，塩酸は富士フイルム和光純薬製のアミノ酸自動分析用を用い，その他の溶媒はすべて富士フイ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・テクノロジー製のBond Elut PRS（充填剤量1 g）を用いた．

2. 防虫加工剤試験法¹⁾

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．ヘキサン層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．その後，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．試験溶液1 mLに対し内部標準溶液を50 μLを加え，さらにDTTB分析用の試験溶液には0.2 mol/L PTAH溶液を100 μLを加えた．

3. 添加回収試験及び定量下限値の算出

試料中のディルドリン及びDTTBの濃度が3 μg/g及び30 μg/gにおける添加回収試験（n=6）を行った．添加試料には，市販のウール100%のフェルトを用いた．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．HPLC/PDAにおけるディルドリンの定量下限値のみ，感度不足のため30 μg/gの結果を用いて算出した．

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
nishi.vjb@pref.kanagawa.jp

2 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

4. 水素キャリアガス-GC/MSの分析条件

分析機器はアジレント・テクノロジーの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。カラムはアジレント・テクノロジーのDB-5MS UI (長さ 20 m; 内径 0.18 mm; 膜厚 0.18 μ m)を用い、カラムオーブンプログラムは100℃(0.5分)→26℃/min→240℃→13℃/min→280℃(5分)に設定した。試料注入は2 μ L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ビオン源温度はそれぞれ240℃, 280℃, 300℃とした。DTTBの誘導体化生成物は2種生成するが、より定量性に優れている保持時間が短い方(Me-DTTB-1)のピーク面積を用いて定量を行なった¹⁾。

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-d₁₀), 240 (クリセン-d₁₂)とし、確認イオン(m/z)は277 (デイルドリン), 464 (Me-DTTB-1), 106 (フルオランテン-d₁₀), 236 (クリセン-d₁₂)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。

5. HPLC/PDAの分析条件

HPLCシステムは、LC-30ADポンプ、SIL-30ACオートサンプラ、SPD-M30A フォトダイオードアレイ(PDA)検出器およびCTO-20ACカラムオーブンから構成される島津製作所社製NexeraX2システムを用いた。カラムは化学物質評価研究機構のL-column 3 C18 (5 μ m, 4.6×150 mm)を用い、確認試験用としてジーエルサイエンスのInertSustain Phenyl (5 μ m, 4.6×150 mm)についても検討した。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10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25分までに50:50へ直線的に変化させた。InertSustain Phenylカラム使用時は、溶離液の組成を試料注入から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。方法2. に示した方法で得られた試料溶液を、窒素気流下で乾固後、溶離液(A:B=50:50)に溶解し分析した。

結果及び考察

1. 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、これまでヘリウムガスをキャリアガスとして用いてきたGC/MSのガスラインに3方コックで水素のラインを取り付けた機器を用いた。キャリアガスを水素に切り替え3日目後に、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・テクノロジーの資料³⁾によると、水素キャリアガスへの切り替え後、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。この現象は、配管等に付着した汚れが水素の還元作用によって溶出されることが原因として考えられている。そこで、溶媒(酢酸エチル/メタノール=1/1)の分析を連日行ってベースラインを確認したところ、10日目以降にその低下が落ち着いた(データ不掲載)。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日間程度かかる可能性があると考えられた。

また、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undanceの変化に関する検討を行った。今回の分析対象物質はデイルドリン及びDTTBであるが、DTTBはGC/MSによる分析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の分析はデイルドリンの検討後に検討することとした。したがって、まずはデイルドリンと内部標準物質として用いたフルオランテン-d₁₀及びクリセン-d₁₂について検討を行った。

水素キャリアガス変更から3日目にデイルドリン30 ng/mL及び、フルオランテン-d₁₀ 500 ng/mL, クリセン-d₁₂ 500 ng/mLの標準液を分析したところ、デイルドリンのピークは積分が困難なほど小さく、クリセン-d₁₂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-d₁₂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1)。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1)。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対策として有効で

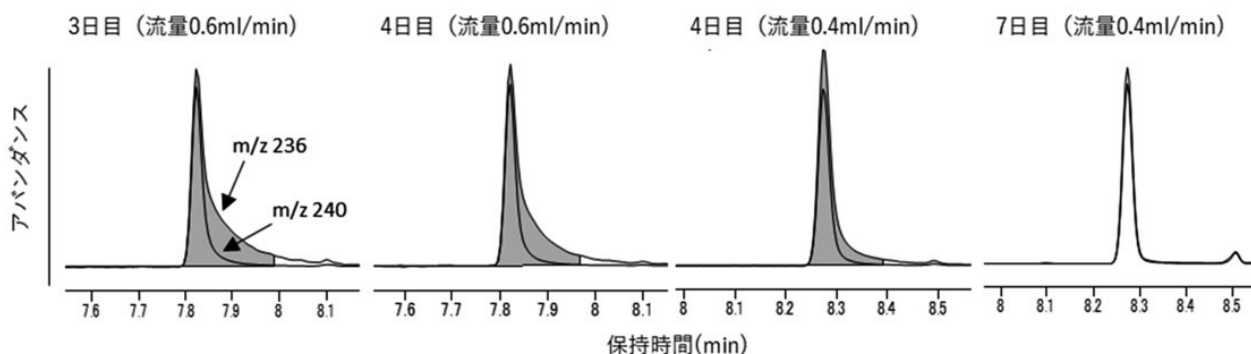


図1 水素キャリアガス切り替え後の経過時間及びカラム流量によるクリセン- d_{12} のピーク形状の変化（定量イオン m/z 240に対し、定性イオン236の形状変化が顕著）

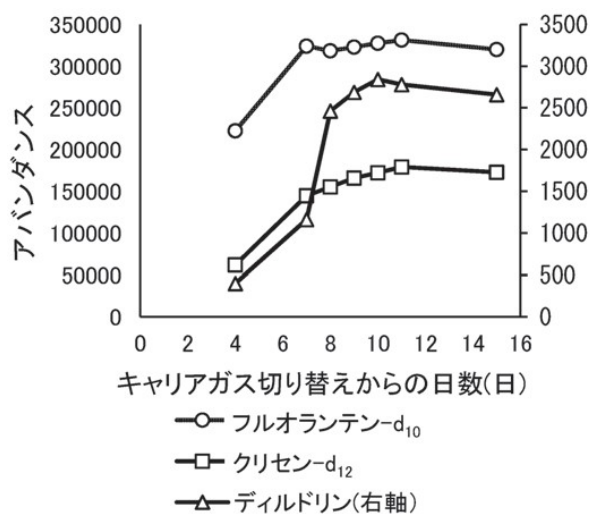


図2 水素キャリアガス切り替え後の各分析対象物質のレスポンスの変化（ディルドリン 3 ng/mL、フルオランテン- d_{10} 500 ng/mL、クリセン- d_{12} 500 ng/mL）

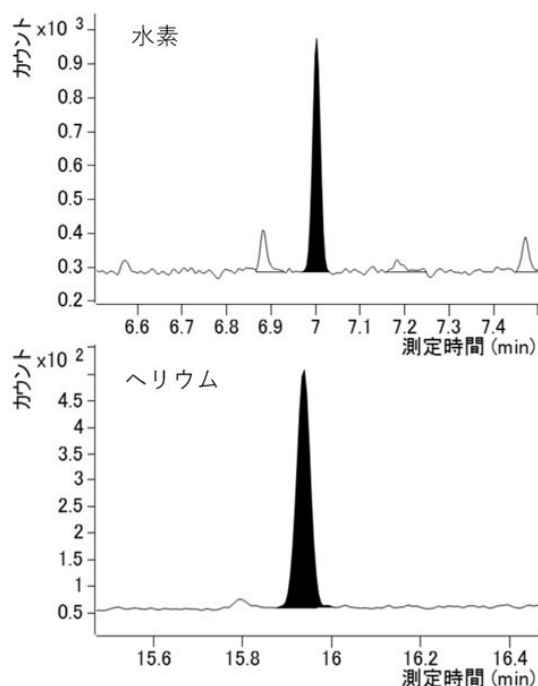


図3 水素キャリアガス時（上）とヘリウムキャリアガス時（下）のピークの比較（ディルドリン濃度 10 ng/mL）

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_{10} 及びクリセン- d_{12} のレスポンスの変化を図2に示した。フルオランテン- d_{10} 及びクリセン- d_{12} 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、今回の結果では、化合物ごとに安定化までの挙動が異なっていたことから、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安定化を確認する必要があると考えられた。ベースライン安定化後のディルドリンのクロマトグラムはヘリウムキャリアガス時と比べてノイズが大きいものの、良好なピークが得られた（図3）。

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、 $R^2=0.99$ 以上の直線性の高い検量線が得られた（図4）。また、我々が開発した新試験法¹⁾を用いて添加回収試験を $n=6$ で行った。その結果、回収率及び相対標準偏差（RSD）は、基準値（30 $\mu\text{g/g}$ ）濃度で添加すると98.5%及び1.0%、基準値の1/10（3 $\mu\text{g/g}$ ）で88.7%及び6.8%と良好な結果が得られた。3 $\mu\text{g/g}$ での添加回収試験における定量値の標準偏差の10倍として定量下限値を算出したところ、1.8 $\mu\text{g/g}$ であった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は1.3 $\mu\text{g/g}$ であり¹⁾、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。我々が開発した新試験法¹⁾では、注入口でメチル化反応が進行するPhenyltrimethylammonium Hidroxide (PTAH)を用いている。これまで、PTAHを水素キャリアガスで用

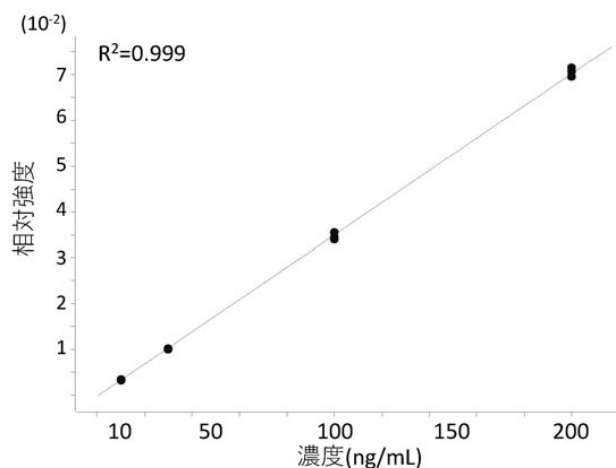


図4 水素キャリアガス-GC/MSにおけるディルドリンの検量線(10-200 ng/mL, 各点n=3)

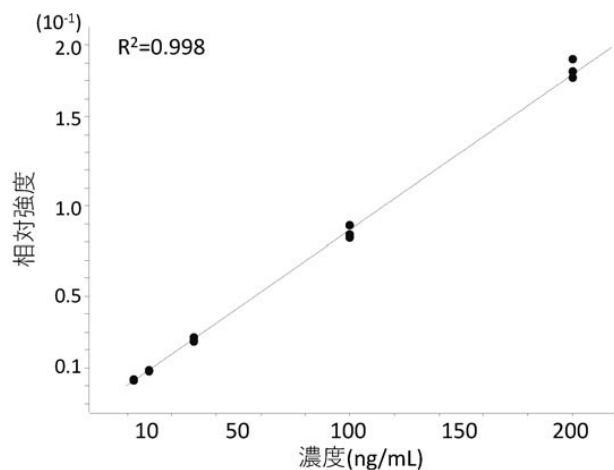


図5 水素キャリアガス-GC/MSにおけるDDTBの検量線(3-200 ng/mL, 各点n=3)

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、DDTBの検量線を作成すると、ディルドリンの時と同様に良好な直線性が得られた（図5）。また、添加回収試験の結果、回収率及びRSDは基準値（30 $\mu\text{g/g}$ ）で105.6%及び3.3%、基準値の1/10（3 $\mu\text{g/g}$ ）で89.1%及び4.5%と良好な結果が得られた。3 $\mu\text{g/g}$ での添加回収試験における定量値の標準偏差の10倍として定量下限値を算出したところ、1.3 $\mu\text{g/g}$ であった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は0.72 $\mu\text{g/g}$ であり¹⁾、そのおよそ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DDTB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も使用可能であることが分かった。

2. HPLC/PDAを用いた分析の検討

水素キャリアガス-GC/MSの使用が水素の安全面等の理由により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。

ディルドリンの吸収極大波長は215 nmであったことから、定量に用いる波長は215 nmが適切であると考えられた（図6）。GC/MSに比べて感度が低く、50 ng/mL未満では十分な大きさのピークを得ることができなかった。しかしながら、基準値である30 $\mu\text{g/g}$ を含有する試料を抽出した場合の試験溶液濃度である150 ng/mLを含む、50-2000 ng/mLの範囲における検量線を作成したところ、図7のように $R^2=0.99$ 以上の良好な検量線が得られた。

続いて、DDTBのUVスペクトルを確認したところ、吸

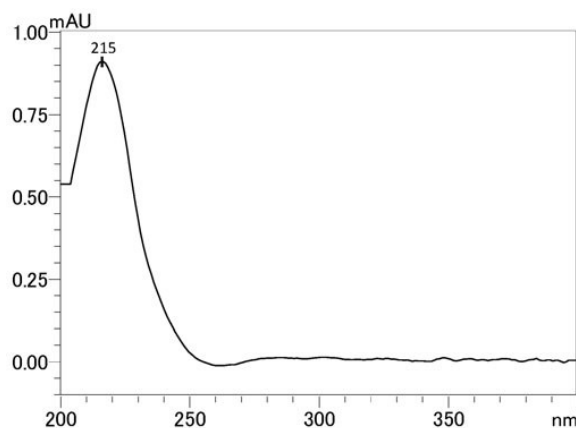


図6 ディルドリンのUVスペクトル

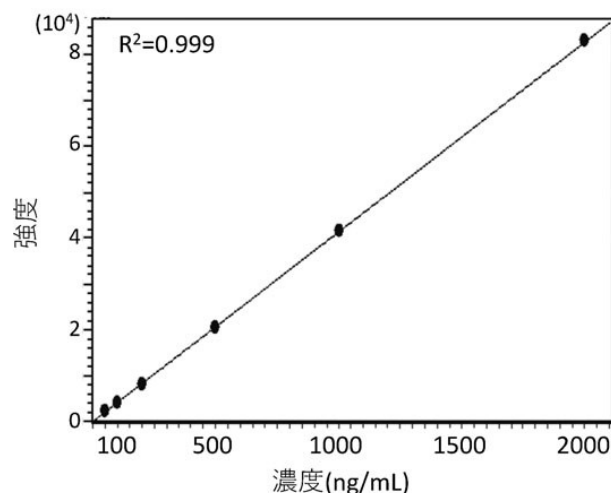


図7 HPLC/PDAにおけるディルドリンの検量線(50-2000 ng/mL, 各点はn=3の平均値)

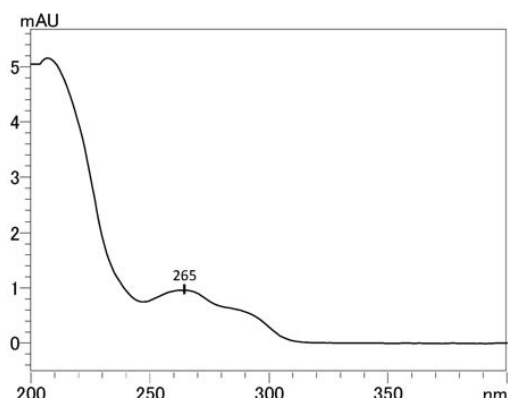


図8 DTTBのUVスペクトル

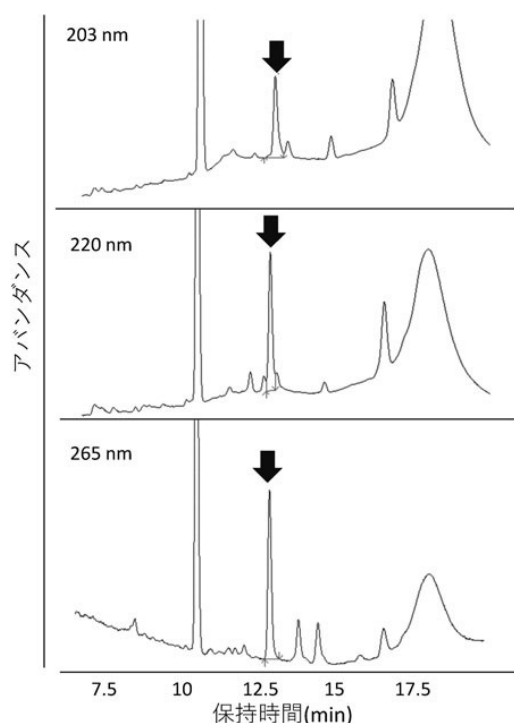


図9 測定波長ごとのDTTBのクロマトグラムの比較
(上:波長203 nm, 中:波長220 nm, 下:波長265 nm)

収極大波長は203 nm, 265 nmであった(図8)。三好ら⁴⁾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9)。したがって、DTTBの定量に用いる波長は265 nmとした。10-2000 $\mu\text{g/mL}$ における検量線を作成したところ、図10のとおり $R^2=0.99$ 以上の良好な検量線が得られた。

次に、検討の結果で得られた分析条件を用いて添加回収試験を行った。デイルドリンは装置の感度不足のため基準値である30 $\mu\text{g/g}$ で試験を行った。回収率は103.5%、RSDは1.7%と良好な結果が得られた。また、DTTBにつ

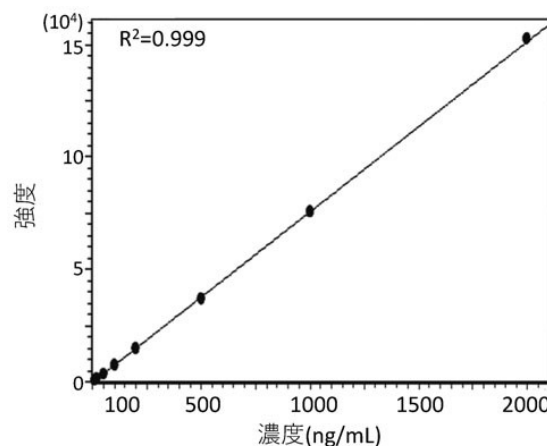


図10 HPLC/PDAにおけるDTTBの検量線 (10-2000 ng/mL, 各点はn=3の平均値)

いては3 $\mu\text{g/g}$ 及び30 $\mu\text{g/g}$ 添加試料で試験を行った。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。さらに、デイルドリンは30 $\mu\text{g/g}$ 、DTTBについては3 $\mu\text{g/g}$ 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、デイルドリンが5.2 $\mu\text{g/g}$ 、DTTBが1.3 $\mu\text{g/g}$ であった。デイルドリンの定量下限値がGC/MSのものよりかなり高かったものの、いずれの値も基準値(30 $\mu\text{g/g}$)より十分に低い値であったことから、代替分析法としての要件は満たしていると考えられた。

一方で、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標準溶液のものとスペクトル比較を行ったところ、図11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方法を検討した。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12に示したようにクロマトグラムは変化した、各物質の保持時間(デイルドリン: 6.73 min, DTTB: 6.90 min)は標準溶液の保持時間(デイルドリン: 6.73 min, DTTB: 6.91 min)とよく一致した。このことから、異なるカラムによる確認試験も選択肢として利用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。

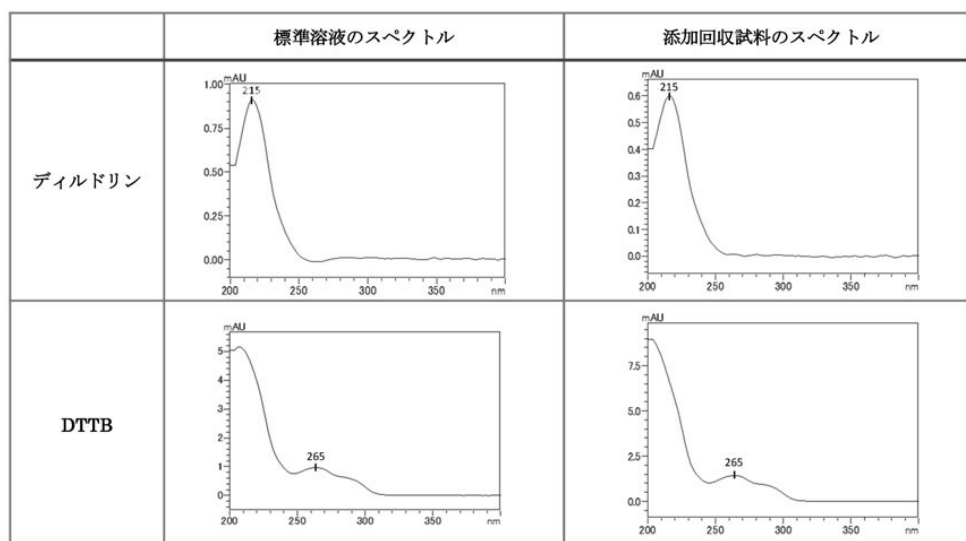
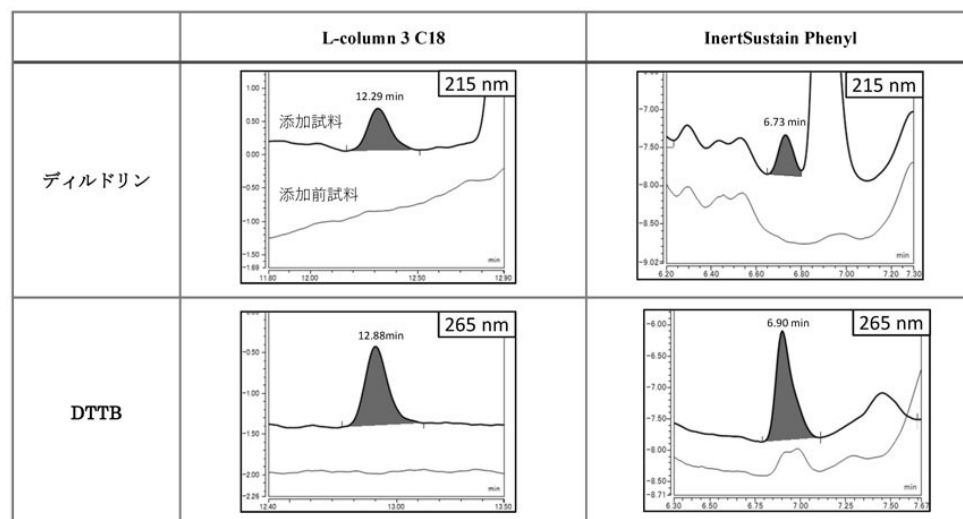


図11 標準溶液と添加回収試料におけるUVスペクトルの比較

図12 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
(いずれも上が30 μ g/g添加試料, 下が添加前試料)

まとめ

本研究では、我々が先行研究で開発した繊維製品中の防虫加工剤改正分析法について、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。その結果、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 μ g/gを下回る定量下限値が得られることがわかった。本研究の結果から、水素キャリアガス-GC/MS及びHPLC/PDAは代替分析法として利用可能であると考えられた。

謝辞

本研究は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）「H29-化学-指定-002」にて実施しました。

参考文献

- 1) 西以和貴, 佐藤学, 仲野富美, 辻清美, 上村仁, 河上

強志：繊維製品中のディルドリン及びDTTB分析法の開発, YAKUGAKU ZASSHI, 140, 809-818 (2020)

- 2) 一般社団法人日本物理学会：声明「ヘリウムリサイクル社会を目指して」〈<https://www.jps.or.jp/information/docs/seimei20191220.pdf>〉(2020/4/21アクセス)
- 3) 代島茂樹：水素キャリアガスによる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〉(2020/4/21アクセス)
- 4) 三好保, 石川英樹, 藤井正信, 黒田弘之：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(1984)