

羊毛繊維製品防虫加工剤 4, 6-ジクロロ-7-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール (DTTB) の紫外分光光度計検出器付高速液体クロマトグラフィーによる定量法

石川 英樹, 西岡 千鶴, 毛利 孝明, 黒田 弘之

Quantitative Determination of the Mothproofing Agent, 4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB) in Wool Fabrics by High Performance Liquid Chromatography using Ultraviolet Spectrophotometric Detector

Hideki Ishikawa, Chizuru Nishioka, Takaaki Mouri and Hiroyuki Kuroda

4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB), which was used as a mothproofing agent in wool fabrics, was quantitatively determined by high performance liquid chromatography using ultraviolet spectrophotometric detector. DTTB was extracted with diethyl ether from 10% sodium hydroxide solution of wool fabrics. The extracts was cleaned up by the use of SEP-PAK C₁₈ cartridge with acetonitrile/(1→2000) aqueous ammonia (1:2) as an eluent. The eluent was concentrated and dissolved in ethanol containing anthracene as an internal standard. DTTB was separated on a column packed with LiChrosorb RP-18, 5 μ m, (4×250mm) by the use of acetonitrile/0.0087 M acetic acid and 0.0013 M ammonium acetate in water (3:1) as the mobil phase, with detection at 220 nm. The calibration curve was linear in the range from 1 ng to 80 ng. The limit of detection was 1 ng of DTTB and 0.4 μ g/g in samples. The recoveries of DTTB added to diethyl ether extracts from socks and neckties were 97.2–99.5% and 97.4–98.9%, respectively.

I 緒 言

羊毛繊維製品の防虫加工剤として使用されていた 4, 6-ジクロロ-7-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール (DTTB) (Fig. 1) は, 「有害物質を含有する家庭用品の規制に関

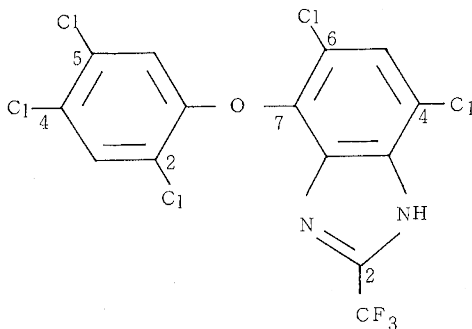


Fig. 1. Structural formula of 4,6-dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB)

する法律¹⁾によって昭和57年4月1日より30 μ g/g以下の規制値が定められた。

DTTBの定量法は, DTTBをメチル化して電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーを使用する方法 (ECD-GC)²⁾, 充填剤にシリカゲルを用い順相モードで紫外分光光度計検出器付高速液体クロマトグラフィーを使用する方法 (UV-SI-HPLC)³⁾ および化学結合型充填剤を用い逆相モードで蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーを使用する方法⁴⁾ (FP-RP-HPLC) などが報告されている。しかしながら, ECD-GC²⁾ は発ガン性のあるジメチル硫酸によるメチル化を行なった後, n-ヘキサン抽出が必要など操作が煩雑であり, UV-SI-HPLC³⁾ は定量限界が30 μ g/gと低く, FP-RP-HPLC⁴⁾ は一部検体のクリーンアップが不完全であり定量限界を低くする必要があるなど, これまで報告された方法には種々の問題点がある。

今回われわれは, 公定法⁵⁾に準じ繊維中のDTTBを抽出し, セツパック C₁₈ カートリッジ (SP-C₁₈) によっ

て精製した後、化学結合型充填剤を用い逆相モードで、測定波長を220nmに設定した紫外分光光度計検出器付高速液体クロマトグラフィーを使用して簡便かつ高感度にDTTBを定量する方法を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 器具および試薬等

1) 器具および装置

振とう機：池本理化学工業製 4302 型，遠心機：久保田商事製KN-70型，HPLC：島津製作所製LC-3 A型ポンプ：同SIL-IA型サンプルインジェクター：同SPD-2A型紫外分光光度計検出器；日本電子科学製U-228型記録計以上を接続して使用，HPLC用カラム：MERCK社製LiChrosorb RP-18(5 μ m)を平衡スラリー法で4.0 \times 250mmのステンレスカラムに充填して使用，ECD-GC：島津製作所製GC-4BM型(⁶³Ni-ECD付)，pHメーター：CORNING社製M-130型，超音波洗浄器：ヤマト科学製220型，ロータリーエバポレーター：柴田化学器械工業製SPC-13型，紫外分光光度計：島津製作所製UV-240型，SP-C₁₈：日本ウォーターズリミテッド社製。

2) 試薬

DTTB：和光純薬工業製家庭用品試験用，アントラセン；ジメチル硫酸：和光純薬工業製一級品，エチルエーテル；硫酸ナトリウム（無水）；n-ヘキサン；アセトン：和光純薬工業製残留農薬試験用，その他の試薬は市販特級品を使用。

3) 内部標準溶液

アントラセン10 μ gをエチルアルコールで溶解し100mlとし，その10mlをとってエチルアルコールで100mlとした。

4) DTTB標準溶液

DTTB10 μ gを精秤し内部標準溶液で溶解して100mlとしこの溶液を標準原液とした。この標準原液を内部標準溶液で希釈し標準溶液を調製した。

2. 試験溶液の調製

1) 抽出

公定法⁵⁾に準じ，身体と接触する繊維の部分の細かく切ったものを試料とし，その約0.5gを精秤し50ml容ねじ付遠心沈殿管に入れ，10%水酸化ナトリウム溶液10mlを加え，3時間放置し溶解さす。次にこの液にエチルエーテル10mlを加え5分間激しく振とうした後，10分間4,000回転で遠心分離を行ないエチルエーテル

層を分取する。この操作をさらに3回繰り返し全エチルエーテル層を合わせる。これに硫酸ナトリウム（無水）約5gを加えてよく振り混ぜた後，ガラスろ過器（細孔記号G2）を用いろ過し，エチルエーテル5mlで2回ガラスろ過器を洗浄する。ろ液と洗浄液を100ml容ナス型フラスコに入れ，ロータリーエバポレーターを用いて50 $^{\circ}$ Cでエチルエーテルを留去する。

2) SP-C₁₈による精製

1) で得た残留物にエチルアルコール1mlを加え，超音波洗浄器を用いて溶解した後，（1 \rightarrow 2,000）酢酸溶液2mlを加えてかくはんする。次に，この溶液をあらかじめエチルアルコール10mlで蒸留水10mlを通したSP-C₁₈を取り付けた10ml容のシリンジの中に入れ，プランジャーを戻してシリンジ内の溶液を溶出さす。さらにナス型フラスコをエチルアルコール / （1 \rightarrow 2,000）酢酸（1 : 2）3mlで超音波洗浄器を用いて洗浄した後，この溶液をシリンジ内に入れプランジャーを戻す。この操作をさらにもう一度繰り返した後，アセトニトリル / （1 \rightarrow 2,000）アンモニア水（1 : 2）10mlをシリンジ内に入れプランジャーを戻してDTTBを溶出さし，50ml容ナス型フラスコに取る。ロータリーエバポレーターを用い70 $^{\circ}$ Cで溶媒を留去する。水分が残留する場合はエチルアルコールを約10ml加えてさらに留去を行う。残留物に1mlの内部標準溶液を加えて溶解した後，この5 μ lをHPLCに注入する。以上の操作の概略をScheme 1に示した。

Wool fabrics (0.5g)

- 1) dissolve in 10 ml of 10% NaOH
- 2) permit to stand for 3 hours
- 3) extract with 10 ml of Et₂O and centrifuge at 4000 rpm
- 4) repeat 4 times

Et₂O layer

- 1) dry over Na₂SO₄
- 2) evaporate to dryness under reduce pressure at 50 $^{\circ}$

Et₂O extracts

- 1) dissolve in 1 ml of EtOH using ultrasonic bath and add 2 ml of (1 \rightarrow 2000) AcOH
- 2) inject to SEP-PAK C₁₈ cartridge (SP-C₁₈)
- 3) inject to SP-C₁₈ in 3 ml rinses of EtOH / (1 \rightarrow 2000) AcOH (1:2) using ultrasonic bath
- 4) repeat once
- 5) elute DTTB with 10 ml of CH₃CN / (1 \rightarrow 2000) NH₄OH (1:2)
- 6) evaporate to dryness under reduce pressure at 70 $^{\circ}$
- 7) dissolve the residue in 1 ml of EtOH containing I.S. using ultrasonic bath

Inject to HPLC (5 μ l)

Scheme 1. Analytical procedure for DTTB

ここで使用したSP-C₁₈ はエチルアルコール10ml次いで蒸留水10mlを通して再利用した。

3) HPLC測定条件

カラム: LiChrosorb RP-18 (5 μm) (Merck 社製) 4.0×250mm ステンレス, 移動相: アセトニトリル / 0.0087 M 酢酸 - 0.0013 M 酢酸アンモニウム (pH 3.96) (3:1) (減圧下, 超音波洗浄器による脱気を行なった後使用), 流速: 1.0 ml/min, 測定波長: 220 nm, 感度: 0.04 AUFS, カラム温度: 室温

III 実験結果および考察

1. SP-C₁₈ による精製

試料のエチルエーテル抽出物は多量の妨害物質を含有しているためDTTBの分析にはクリーンアップが必要であった。そこで, SP-C₁₈ による精製法を検討した。

解離性の物質を化学結合型のODS系充填剤を使用したHPLCで分析するとき, 移動相のpHの変化に伴ってその保持容量が大きく変動することが知られている⁶⁾。また, 荻原らは, 逆相型の充填剤を使用したHPLCにおいて, 移動相が酸性条件下ではDTTBの保持容量が増大することを報告している⁴⁾。このことから, 逆に移動相を塩基性にするによってDTTBの保持容量が減少することが予想される。したがって, 逆相型の充填剤を使用しているSP-C₁₈についても上記と同様に, DTTBは移動相

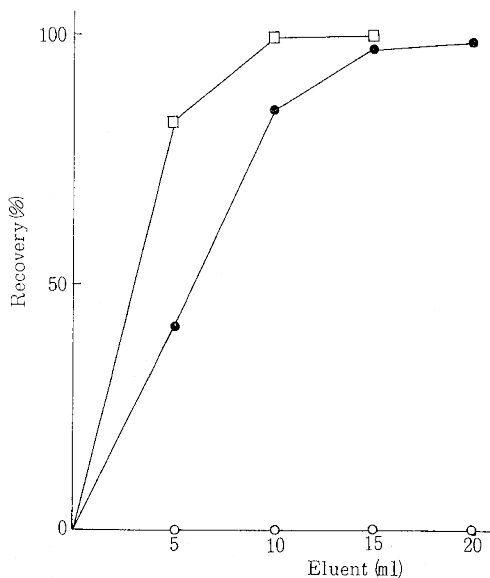


Fig. 2. Effect of pH of eluent on elution of DTTB from SEP-PAK C₁₈ cartridge

- : EtOH/(1→1000)AcOH (pH 3.89) (1:1)
- : EtOH/H₂O (pH 5.94) (1:1)
- : EtOH/(1→1000)NH₄OH (pH 10.53) (1:1)

を酸性にすると保持され, 逆に塩基性ではすみやかに溶出されると推定した。そこで以下の実験を行なった。

エチルエーテル抽出物はメチルアルコールやアセトニトリルでは不溶であったがエチルアルコールに可溶であったので, エチルアルコールをSP-C₁₈ への注入用の有機溶媒として使用した。さらに, 酸性物質として酢酸を, 塩基性物質としてアンモニア水を使用して移動相のpHを変化させ, SP-C₁₈ からのDTTBの溶出量の変化を調べたところ, Fig. 2 に示す結果が得られた。酸性条件下では20 mlでも溶出が認められなかったが, 塩基性条件下では初めの5 mlですでに82%の溶出が認められ, 15 mlで完全に溶出した。この性質を利用することによって, 妨害物質をSP-C₁₈ に保持させたままDTTBをすみやかに溶出させることが可能と思われた。

次に, DTTBの溶出におよぼす有機溶媒の種類と濃度比の影響を調べた。すなわち, エチルアルコール-希酢酸系の混合溶媒によってSP-C₁₈ 中にDTTBを保持させた後, エチルアルコール-希アンモニア水系またはアセトニトリル-希アンモニア水系の混合溶媒を用いてDTTBを溶出させた。その溶出量の変化をFig. 3 に示した。Fig. 3 より, 塩基性条件下でのDTTBの溶出は有機溶媒と希アンモニア水の組成比が同一の場合はエチルアルコール

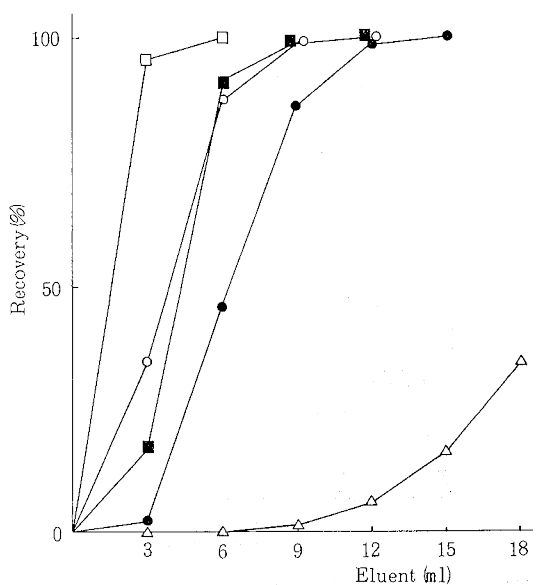


Fig. 3. Effect of several eluents on elution of DTTB

- : EtOH/(1→1000)NH₄OH (2:3) 1)
 - : EtOH/(1→1000)NH₄OH (1:2) 2)
 - : CH₃CN/(1→1000)NH₄OH (1:2) 2)
 - : CH₃CN/(1→1000)NH₄OH (1:3) 2)
 - △-△: CH₃CN/(1→1000)NH₄OH (1:4) 2)
- retentive solution
- 1) EtOH/(1→1000)AcOH (2:3) 3 ml×3
 - 2) EtOH/(1→1000)AcOH (1:2) 3 ml×3

系よりもアセトニトリル系の方が少量で可能であることが認められた。また、実試料の場合でもエチルアルコール系よりもアセトニトリル系の方がHPLCのクロマトグラム上の妨害ピークが減少することが認められた。このことから、DTTBのSP-C₁₈への保持溶媒としてエチルアルコール/希酢酸(1:2)を用い、溶出溶媒としてアセトニトリル/希アンモニア水(1:2)を用いることにした。

次に、酢酸とアンモニア水の希釈率をそれぞれ1→100,000から1→200までの6段階に変化させ、SP-C₁₈のDTTBの保持と溶出の変化を調べた。エチルアルコール-希酢酸系の保持溶媒ではいずれの希釈率でも完全に保持されたが、アセトニトリル-希アンモニア水系による溶出では希釈率によって変化が認められた。その変化をFig. 4に示した。希釈率が1→100,000では12mlで27%しか溶出が認められなかったが、1→20,000では9mlで98%溶出した。しかし、1→2,000から1→200までの希釈率ではいずれも6mlで99%以上の溶出が認められた。SP-C₁₈の劣化の防止の点から塩基の濃度は低い方が望ましいので、希釈率として1→2,000を使用することにした。

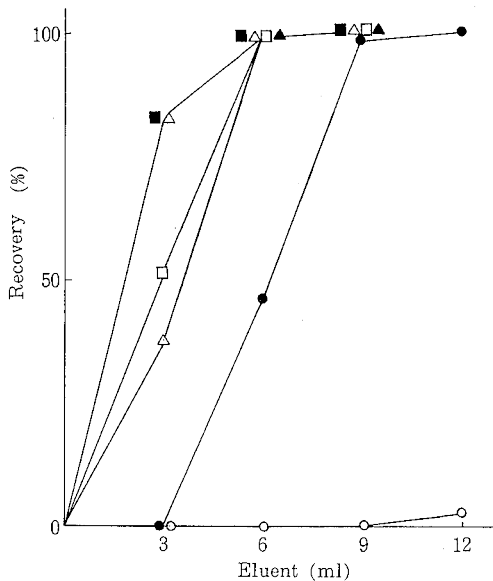


Fig. 4. Effect of dilution ratio of aqueous ammonia

- : 1→100000 (pH 9.21)
- : 1→20000 (pH 9.77)
- : 1→10000 (pH 9.97)
- : 1→2000 (pH 10.39)
- △—△ : 1→1000 (pH 10.53)
- ▲—▲ : 1→200 (pH 10.90)

eluent: CH₃CN/dil. NH₄OH (1:2)
retentive solution: EtOH/dil. AcOH (1:2) 3ml×3

以上の結果、エチルアルコール/(1→2,000)酢酸(1:2)3mlで3回、SP-C₁₈に注入することによりDTTBを保持させ、溶出にはアセトニトリル/(1→2,000)アンモニア水(1:2)10mlを用いることにした。いずれの場合も流出速度は15ml/min以下で行なった。実試料の場合、エチルアルコール/(1→2,000)酢酸(1:2)3mlを直接エチルエーテル抽出物に加えても溶解しない場合が多かったため、最初だけエチルアルコール1ml加えて溶解した後、(1→2,000)酢酸2mlを加える方法を行なった。さらに溶解を確実にするため超音波洗浄器を利用した。本法によりHPLCのクロマトグラム上の妨害ピークを完全に除去することができた。

使用済みのSP-C₁₈はエチルアルコール10ml、次いで蒸留水10mlを通して再生した後再利用した。この方法で実試料20件を連続して使用した後、標準のDTTBを用いて変化を調べたが変動は認められなかった。迅速でかつ再利用が可能であることから、HPLCにおける妨害物質の除去にSP-C₁₈を利用することは有効であった。

2. 内部標準物質

定量精度の向上のため内部標準物質の使用を検討した。そこで、DTTBの吸収極大付近に吸収があり、移動相のpHによって保持容量の変動がない中性物質としてジフェニールとアントラセンを選んだが、保持容量の大きいアントラセンを内部標準物質とした。

3. 移動相の検討

Fig. 5に示すように、DTTBの紫外部の吸収極大は284

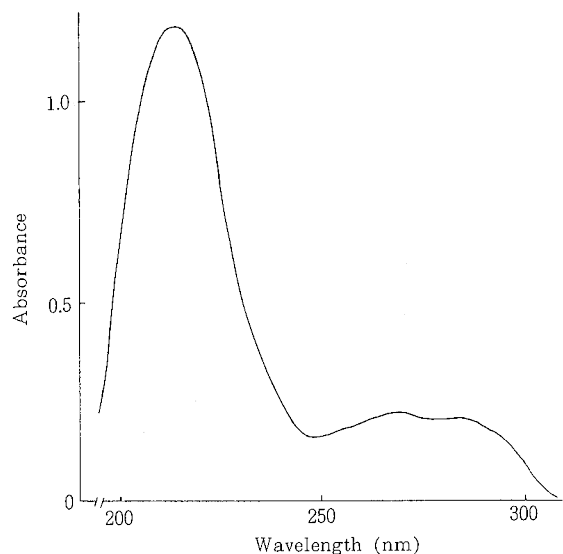


Fig. 5. Absorption spectrum of DTTB

concentration: 10 μg/ml; solvent: CH₃CN/0.0087 M AcOH-0.0013 M AcONH₄ (3:1)

nm, 268nmおよび214nm付近に存在するが, 214nmの吸光度は他のものより約5倍の強度がある。したがって, この波長を測定波長にすることによって高感度の測定が可能となる。そのためには, この波長で吸収の小さい移動相が必要であり, 充填剤として逆相型のLiChrosorb RP-18を使用しているので, 移動相の有機溶媒としてメチルアルコール, エチルアルコールおよびアセトニトリルを選んだ。メチルアルコールやエチルアルコールはポンプ圧が高くなりカラムの劣化が懸念される。また, ピークの形状もブロードになることが認められた。そこで, アセトニトリルを移動相の有機溶媒に使用した。

イオン対クロマトグラフィーのカウンターイオンとして使用されるn-ヘプタンスホン酸ナトリウムの水溶液とアセトニトリル, あるいはリン酸塩を用いた緩衝液とアセトニトリルによる移動相ではDTTBの保持容量が時間の経過とともに減少する傾向が認められた。そこで, 酢酸と酢酸アンモニウムを用いた緩衝液とアセトニトリルによる移動相を使用したところこの変化が認められなかったので, 以下この移動相を用いて最適条件を検討した。

アセトニトリルと緩衝液の比を一定とし, 緩衝液中の酢酸と酢酸アンモニウムの濃度比を変えてDTTBの保持容量の変化をみたところ, Fig. 6に示すような変化が認め

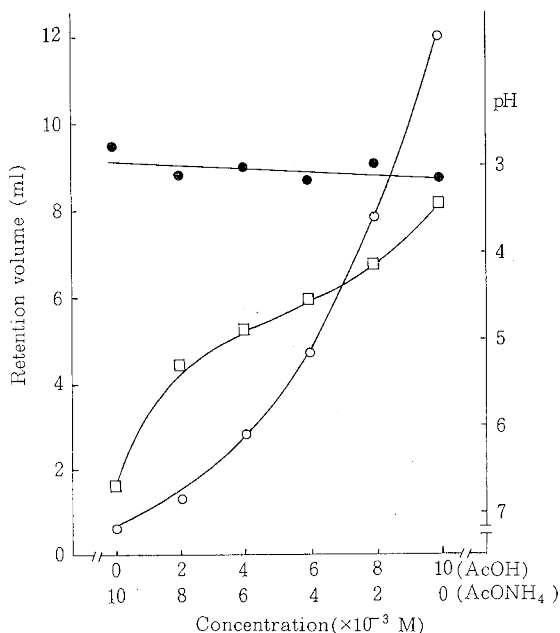


Fig. 6. Effect of concentration ratio of acetic acid and ammonium acetate in buffer on retention volume

○-○:DTTB; ●-●:anthracene; □-□:pH
mobile phase:CH₃CN/buffer(7:3)

められた。すなわち, 酢酸の濃度比が増加するにしたがってpH値が低くなり, それに伴ってDTTBの保持容量が増加した。しかし, 中性物質であるアントラセンの保持容量には変化が認められなかった。

次に, 緩衝液の酢酸と酢酸アンモニウムの濃度を一定にし, アセトニトリルと緩衝液の保持容量の変化を調べた。その結果をFig. 7に示した。アセトニトリルの組成比が増加するにしたがってDTTBおよびアントラセンの保持容量が減少したが, アセトニトリルと緩衝液の組成比が66:34において保持容量の逆転が認められた。

次に, アセトニトリルと緩衝液の組成比を3:1にし, また緩衝液の酢酸と酢酸アンモニウムのモル濃度比を85:15にして, 緩衝液のモル濃度を10⁻⁵から10⁻²のオーダーの間で変化させたところ, Fig. 8に示す結果が得られた。濃度が大きくなるに従ってpH値が低くなり, それに伴ってDTTBの保持容量が増加した。しかし, アントラセンの保持容量には変化が認められなかった。また, DTTBのピークの高さは10⁻⁴から10⁻³のオーダーで最も高くなった。

化学結合型の充填剤を使用したカラムでは緩衝液の濃度は薄い方が望ましく⁶⁾, またピークが高く, 内部標準で

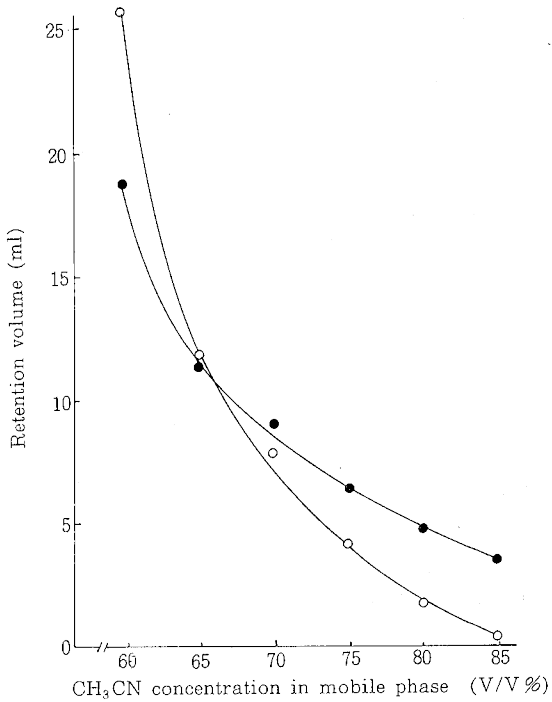


Fig. 7. Effect of cocentration of acetonitrile in mobile phase on retention volume

○-○:DTTB; ●-●:anthracene; buffer:0.0085 M
AcOH and 0.0015 M AcONH₄ in water

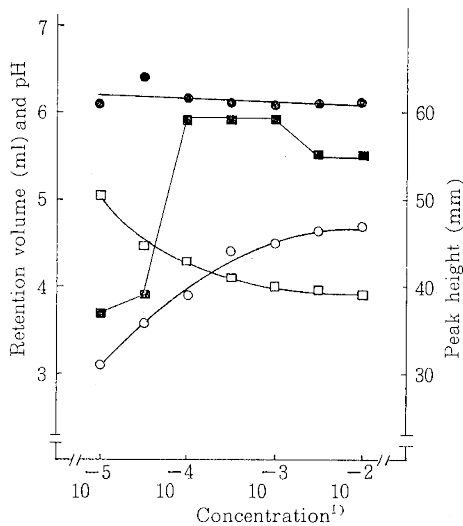


Fig. 8. Effect of concentration of acetic acid and ammonium acetate in buffer on retention volume and peak height

1) : AcOH, $\times 8.5$ M; AcONH₄, $\times 1.5$ M
 ○: DTTB; ●: anthracene; □: pH; ■: peak height; mobile phase: CH₃CN/buffer (3:1)

あるアントラセンとの分離が完全であることから、最終的に酢酸と酢酸アンモニウムのモル濃度をそれぞれ 0.0087 M と 0.0013 M にした緩衝液 (pH 3.96) を使用し、アセトニトリルと緩衝液の組成比を 3 : 1 にした移動相を使用することにした。

4. 測定波長

DTTB を移動相に溶解した溶液の紫外外部吸収スペクトルを Fig. 5 に示したが、214 nm に最大の吸収極大が認められた。そこでこの付近で検出感度を調べたところ、220 nm において S/N 比が一番高かったので 220 nm を測定波長とした。

5. 検量線と検出限界

検出器の感度を 0.04 AUFS にし、内部標準物質とのピーク高比により検量線を作成したところ、 $\ln g$ から 80 ng の範囲で原点を通る直線になった。試料採取量を 0.5 g, HPLC 用試料液量を 1 ml とし、HPLC に 5 μ l 注入する条件で定量限界は 0.4 μ g/g (S/N=6) であった。

6. 添加回収実験

試料から DTTB のエチルエーテルによる抽出率は 90% 以上であることが報告されている²⁾。そこで、試料のエチルエーテル抽出物に DTTB を添加し、公定法と本法との回収率を比較した。その結果を Table 1 に示した。

7. HPLC クロマトグラム

Fig. 9 に標準 (A)、試料のエチルエーテル抽出物 (B) および (B) の SP-C₁₈ による精製後 (C) の各クロマト

Table 1. Recovery of DTTB to wool fabrics

Sample	Added (μ g)	Recovery (%) ¹⁾	
		ECD-GC ²⁾	HPLC
Socks	100	99.1	99.0
	20	101.7	99.5
	4	98.5	98.0
	1	95.4	97.2
Necktie	100	99.0	98.9
	20	99.7	98.1
	4	96.7	98.5
	1	96.7	97.4

1) mean C.V. (n=4), 2) official method

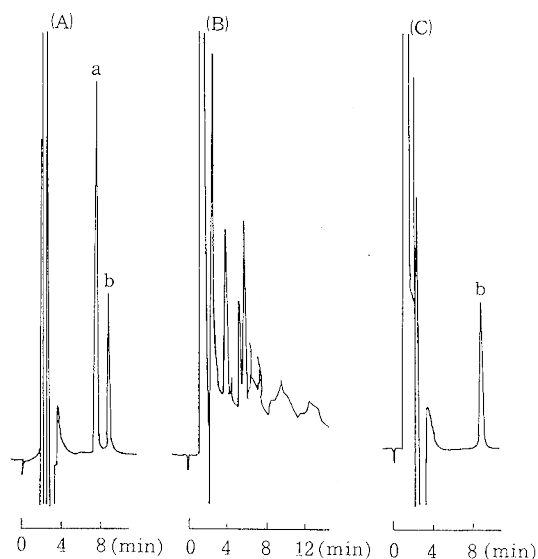


Fig. 9. Chromatograms of DTTB and samples

(A): standard, (B): Et₂O extracts, (C): after purification; peak a: DTTB (50 ng), b: anthracene (50 ng) I.S.

HPLC conditions: column, LiChrosorb RP-18 (5 μ m) 4 \times 250 mm; mobile phase, CH₃CN/0.0087 M AcOH-0.0013 M AcONH₄ (pH 3.96) (3:1); flow rate, 1.0 ml/min; column temp. room temp.; detection, 220 nm; sensitivity, 0.04 AUFS; injection volume, 5 μ l

グラムを示した。

IV ま と め

SP-C₁₈ を用いて精製し、紫外分光光度計検出器付 HPLC により、羊毛繊維製品中の DTTB を簡便で高感度に定量する方法を検討し、次の結果を得た。

1) DTTB を酸性溶媒を用いて SP-C₁₈ 中に保持させ、次いで塩基性溶媒により DTTB をすみやかに溶出さす方法によって妨害物質を完全に除去することがで

きた。使用済のSP-C₁₈はエチルアルコール、次いで蒸留水を通じて再生することにより20回以上の再利用が可能であった。

- 2) HPLCは逆相型の充填剤を用いたカラムを使用し、測定波長を220nmにして測定した。本法の検量線は1 ngから80 ngの範囲で原点を通る直線を示し、定量限界は0.4 μg/g (S/N=6)であった。
- 3) 添加回収実験により97%以上の回収率を示し、その変動係数は3.9%(n=4)以下であった。

文 献

- 1) 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112号)。
- 2) 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 佐藤洋子:羊毛防虫

加工剤の系統分析法, 衛生化学, 25, 80-95 (1979)。

- 3) 萩原輝彦, 寺島潔, 吉原武俊, 下平彰男:有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究(第5報)繊維製品中の有機塩素系防虫加工剤の定量法(II), 東京衛研年報, 31, 77-81 (1980)。
- 4) 萩原輝彦, 寺島潔, 奥本千代美, 長嶋真知子, 秋山和幸:高速液体クロマトグラフィーによる羊毛繊維中の防虫加工剤4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB)の定量法, 衛生化学, 28, 155-159 (1982)。
- 5) 厚生省環境衛生局企画課家庭用品安全対策室編:家庭用品規制関係実務便覧, p. 2043の42, 第一法規出版, 東京(1977)。
- 6) 波多野博行, 花井俊彦:実験高速液体クロマトグラフィー, p. 155, 化学同人, 京都(1977)。