

欧州規格 EN71 により乳幼児用繊維製品に規制されている着色剤の

LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS による分析調査

中島晴信^{*1} 味村真弓^{*1} 山崎勝弘^{*2} 鹿庭正昭^{*3}

We are engaged in the reevaluation and improvement of the testing methods for 16 types of colourants for use in toys made of textiles as regulated by the European Standards EN71, “Safety Regulations of Toys.” First, we examined HPLC separation conditions for the purpose of introducing LC/MS as the final test method. Using a mixture of ammonium acetate and formic acid aqueous solution / acetonitrile as a mobile phase, the mutual separation of 16 types of colourants was possible by using an ODS column. In the next step, the measurement method using LC/TOF-MS was examined via positive/negative mode. The detection limit of the extracted ions from 15 types of colourants was between 0.62 pg (Basic Red 9) and 60 pg (Disperse Blue 1) for S/N=3. Acid Red 26 showed low sensitivity (3 ng). The calibration curves obtained from the peak area value of the extracted ions from each colourant (0.02-5 µg/ml) all showed good linearity. Furthermore, the measurement method using LC/MS/MS was also examined under positive/negative mode. The detection limit of selected reaction monitoring (SRM) ions of 15 types of colourants was between 0.013 pg (Basic Violet) and 1.9 pg (Disperse Orange 37) for S/N=3. Here, Acid Red 26 also showed low sensitivity (0.1 ng). The calibration curve obtained from the peak area value of SRM ions for each colourant (1-1000 ng/ml) all showed good linearity.

The commercially available textile products for infant were used by LC/TOF-MS and LC/MS/MS. As a result, even with low concentrations, 74.2 ng/g of Disperse Orange 3 was detected in one sample, and 112.2 ng/g of Disperse Orange 37 was detected in another sample. These concentration values are much lower than the regulation value (action limit) of EN71 of 10 µg/g. These results show that both the LC/TOF-MS and LC/MS/MS measuring methods are sufficiently accurate to be used as the final determination of safety.

キーワード : 着色剤、欧州規格 EN71、LC/TOF-MS、LC/MS/MS、乳幼児用繊維製品

Key words : colourants, European Standards EN71, LC/TOF-MS, LC/MS/MS, textile products for infant

衣類などの繊維製品には、非常に多種類の染料が着色剤として使用されている。しかし、その中には、皮膚感作性や発癌性を有する物質もある。世界的には、欧州の繊維製品安全性自主基準である OEKOTEX Standard が用いられ、それら染料の溶出量も規定され

ている。特に乳幼児用製品の基準は厳しく定められている¹⁾。しかし、この自主規制は、分析方法などは非公開である。ドイツでは、ドイツ規格 (DIN54231) 及びドイツ日用品規制令 (LMBG) において、アゾ染料・顔料などが規制され、分析法など定められている。さらに中国でも、繊維製品に使用されるアゾ染料から生成する 24 種の芳香族アミンについて、国家的に規制されている。

欧州では、EN71「玩具の安全性規制」の中で繊維製玩具に使用する染料に対して、16 種の着色剤と 9 種の芳香族第一アミン類が規制されている^{2,3)}。この規格で

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

*2 いわき明星大学薬学部 社会薬学部門

*3 国立医薬品食品衛生研究所

Analytical Study Using LC/TOF-MS and LC/MS/MS on Colourants Regulated by European Standards EN71 for Infant Textile Products.

by Harunobu NAKASHIMA, Mayumi MIMURA, Katsuhiko YAMASAKI and Masa-aki KANIWA

は初回試験方法から最終試験方法までの分析法も公開されている^{2,3)}。我々は、初回試験に該当する JIS の汗に対する染色堅牢度試験(JIS L 0801:2004)⁴⁻⁶⁾に加えて人工唾液による溶出試験⁷⁾を既に実施した⁸⁾。EN71 規格では、初回試験で色落ちした製品 (3 級以下) には、最終試験分析法を実施する事になっている。そこで、まず我々は、規制されている 9 種の芳香族第一アミン類の最終試験法である GC/MS (Gas chromatography mass spectrometry) 法による分析調査を行った⁹⁾。EN71 に準拠した我々の分析調査では、規制アミン類は検出しなかった。しかし、河上らは、EU 規制 EN14326 に準拠して市販繊維製品を分析したところ、ランチョンマットから高濃度の (56.2~439 µg/g) benzidine、3,3'-dimethoxybenzidine 及び 2,4-diaminotoluene を検出したことを報告している¹⁰⁾。

次に、16 種の着色剤の最終試験法の第一段階である HPLC-DAD (Liquid chromatography-photodiode array detector) による分析調査を行い、対象の着色剤は検出しなかったことを報告した¹¹⁾。最終試験法の第二段階では、LC/MS (Liquid chromatography mass spectrometry) 及び LC/MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) で測定を行うように記載されている。そこで今回、この LC/MS/MS と分子イオンが同定できる

LC/TOF-MS (Liquid chromatography-time of flight mass spectrometry) による測定条件を検討した。その結果、両法共に高感度な測定が可能となり、最終的判定方法として適用可能な測定法を確立した。さらに、HPLC-DAD による分析調査に用いた市販乳幼児繊維製品 (玩具、衣服) を、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS で分析した。その結果、微量ではあるが、規制着色剤が検出された。これら測定法の検討結果及び市販製品の分析結果を、あわせて報告する。

実験方法

1. 試料

市販の乳幼児用衣服 7 製品(8 部位)、繊維製玩具 5 製品 (12 部位) を HPLC、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS 測定用の試料とした (Table1)。

2. 試薬

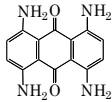
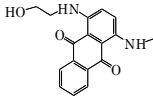
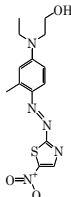
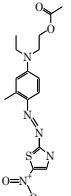
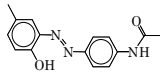
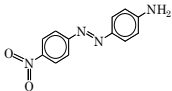
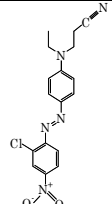
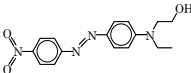
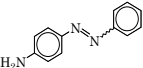
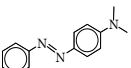
規制されている 16 種の着色剤標準品の製造社名及び CAS 番号や、物理化学的性質を Table 2 に示す。各標準品 5 mg を量り取り、エタノール 100 ml に溶解した。この溶液を 40℃で 1 時間超音波槽に入れて完全に溶解し、50 µg/ml の標準原液を作製した。これを希釈して標準液系列を作成した。

Table 1 Commercially Available Textile Products for Infant Analyzed by HPLC, LC/TOF-MS and LC/MS/MS
(7 Products of Clothing for Infant (8 Parts) and 5 Products of Toys Made of Textile (12 Parts))

No.	Usage	Materials	Manufacturer	Country
1	Coverall	Cotton 100%	Familiar	Japan
2	Trousers	Cotton 100%	BOBSON	China
3	Sweater	Cotton 70%, nylon 15%, wool 15%	BOBSON	China
4	Cut and sewn	Cotton 100%	VON AMMY	China
5	Cut and sewn	Cotton 100%	AEON	China
6	Trousers	Cotton 70%, nylon 90%, polyurethane 10%	AIC	China
7	Coverall	Polyester 100%, cotton 95%, polyurethane 5%	Takiho	China
9	Toy (the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
10				
11				
12	Toy (the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
13				
14				
15	Toy (the stuffed toy)	Unknown	ORGANIC	China
16				
17	Toy (the stuffed toy)	Polyester	TAKARA TOMY	China
18				
19	Toy (clothes of the doll)	Polyester and others	TAKARA TOMY	China
20				

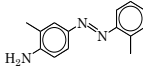
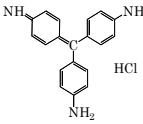
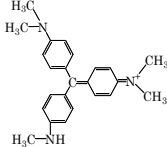
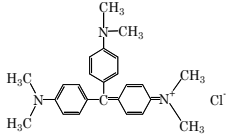
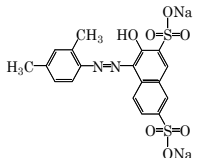
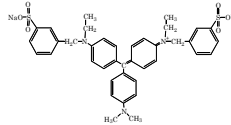
Table 2-1 Physicochemical Properties of 16 Types of Commercialized Colourant Standard Products
Regulated European Norm EN71

(Manufacturers, CAS Number, Molecular Weight, Chemical Structure and Labelling Content (%))

Compounds (Manufacturer)	CAS No.	Molecular Weight	Chemical Structure	Content (%)
Disperse Blue 1 (Aldrich)	2475-45-8	268.2707		—
Disperse Blue 3 (Sigma-Aldrich)	2475-46-9	296.3205		20%
Disperse Blue 106 (FLUKA)	12223-01-7	335.3815		—
Disperse Blue 124 (FLUKA)	61951-51-7	377.423		—
Disperse Yellow 3 (Sigma-Aldrich)	2832-40-8	269.2985		30%
Disperse Orange 3 (Sigma-Aldrich)	730-40-5	242.2334		90%
Disperse Orange 37 (FLUKA)	13301-61-6	392.24		98%
Disperse Red 1 (Aldrich)	2872-52-8	314.3391		95%
Solvent Yellow 1 (Aldrich)	60-09-3	197.2358		98%
Solvent Yellow 2 (Sigma-Aldrich)	60-11-7	225.289		—

— : Not Indicated

Table2-2. Physicochemical Properties of 16 Types of Commercialized Colourant Standard Products
Regulated European Norm EN71
(Manufacturers, CAS Number, Molecular Weight, Chemical Structure and Labelling Content (%))

Solvent Yellow 3 (Sigma-Aldrich)	97-56-3	135.1665		97%
Basic Red 9 (Sigma-Aldrich)	569-61-9	288.3658		85%
Basic Violet 1 (Aldrich)	8004-87-3	358.4987		80%
Basic Violet 3 (Sigma-Aldrich)	548-62-9	407.98		—
Acid Red 26 (Sigma-Aldrich)	3761-53-3	480.4225		—
Acid Violet 49 (Tokyo Chemical Industry)	1694-09-3	733.8712		—

— : Not Indicated

アセトニトリル、エタノールは和光純薬製残量農薬試験用を用いた。純水はミリポア製超純水製造装置(逆浸透膜後、イオン交換処理) Milli RO 5plus, Milli Q plus を通過したものを用いた。

3. HPLC 置及び測定条件

LC/MS 導入のためには、イオン化するための移動相条件が必要である。そのため前報⁹⁾の条件を参考にし、HPLC 分離条件を検討した。

HPLC 装置は以下の島津製作所製の装置を用いた。送液ポンプは、LC-10ADVP、フォトダイオードアレイ検出器は SPD-M10AVP、カラム恒温槽は CTO-10ACVP、オートサンプラーは SIL-10ADVP、コントローラーは SCL-10AVP、データ処理は CLASS-VP を用いた。HPLC カラムは、(財) 化学品評価研究機構製 L-Column ODS-3(4.6mm I.D.×150mm)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH₄ (ギ酸で pH 2.8 に調製) の混合水溶

液の 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 1.5 ml/min とし、A 液と B 液の混合比は、75/25—20/80(60 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、10 µl で、ピークの同定は、リテンションタイム及び UV スペクトルで同定し、定量は、各物質に適した波長で定量した。

4. LC/TOF-MS 装置及び測定条件

HPLC 装置は、Agilent Technologies 社製の Agilent 1200 を用いた。HPLC カラムは、GL サイエンス社製の Inertsil ODS-4(2.1mm I.D.×150mm、5µm)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH₄ と 0.1%HCOOH の混合水溶液を使用した 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 0.2 ml/min とし、A 液と B 液の混合比は、20/80—100/0(30 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、3 µl とした。MS 装置 (TOF-MS) は、Agilent Technologies 社製の Agilent 6200

型を用いた。イオン化法はESI (Electro Spray Ionization) 法での positive 及び negative の両モードで、マスレンジは m/z 100-1000 ピークの範囲で測定した。フラグメンター電圧は 100V に、乾燥ガス (Drying gas) は流量 10L/min で温度 350℃に、ネブライザーガス (Nebulizer gas) 圧力は 345kPa に設定した。参照イオン (Reference mass) は、positive モードでは、 m/z 121.050873 及び m/z 922.009798 を、negative モードでは、 m/z 112.966 を用いた。

5. LC/MS/MS 装置及び測定条件

HPLC 装置は、Agilent Technologies 社製の Agilent 1290LC 型を用いた。HPLC カラムは、Agilent Technologies 社製の Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 mm I.D. ×150 mm、1.8 μ m)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃ に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH₄ と 0.1%HCOOH の混合水溶液を使用した 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 0.25 mL/min とし、A 液と B 液の混合比は、20/80–58/42 (23 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、5 μ l とした。MS 装置 (MS/MS) は、Agilent Technologies 社製の Agilent 6460 型 Triple Quad LC/MS を用いた。イオン化法は、ESI (Electro Spray Ionization) 法の改良法である AJS (Agilent Jet Stream)法による positive 及び negative モードで測定した。乾燥ガス (Drying gas) は流量 10 L/min で温度 350℃に、ネブライザーガス (Nebulizer gas) 圧力は 345kPa に、シースガス (Sheath gas) は流量 12 L/min で温度 400℃に設定した。各着色剤の変換エネルギー (Collision energy)

は、Table 4 に示す。

6. 試験溶液の調製

試料溶液の調製方法は、概ね EN71 の方法に準拠した。試料 (繊維製品) 0.5g を細切し、40 ml のガラスびんに量り採った。エタノール 10ml を加え、ガラスびんを超音波槽に入れ、15 分間放置した。その抽出液をガラスフィルターでろ過して試験管に移した後、アルゴン気流下で 1 ml に濃縮して試験溶液とした。

結果及び考察

1. LC/MS 導入のための HPLC 測定条件の検討

我々は、逆相系カラムの Inertsil ODS-SP を用いて、16 種の着色剤を同時分析できる条件を報告した。この報告では、移動相にアセトニトリルと 10 mM NaH₂PO₄ 混液を用いた。今回、LC/MS 導入のための移動相条件を検討した。そこで、酢酸アンモニウムとギ酸の水溶液及びアセトニトリル混液での分離条件を検討し、実験の章に記載した条件で、16 種の着色剤の相互分離を可能とした。Fig.1 にこれら 16 種の着色剤の 300 nm での HPLC クロマトグラム (各 50 μ g/ml) を示す。また、これらクロマトグラム (50 μ g/ml) の再現性は全て良好であった。各々の物質に適した波長のピーク面積値での検量線 (1~5 μ g/ml) を作成したところ、いずれも R²が 0.99 以上の良好な直線性を示した。定量限界も 1 μ g/ml (10ng) 以下であった。欧州 (EN71) における各物質の規制限度値 (Action limit) は、10 μ g/g (mg/kg)である。これは操作法に従って最終試料溶液を 1 ml のエ

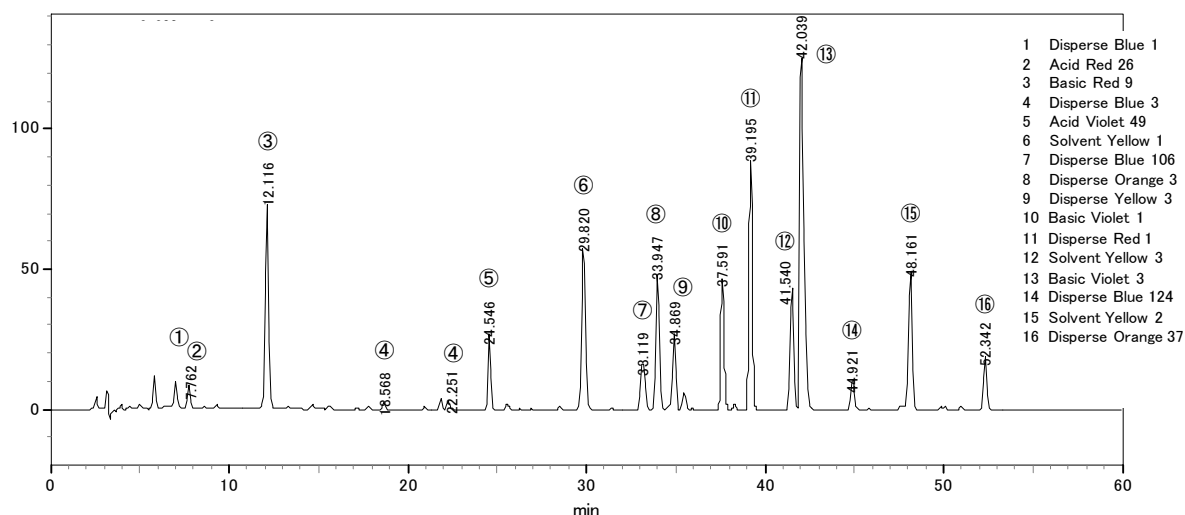


Fig.1 High Performance Liquid Chromatogram of 16 Types of Colourants

Operating conditions of HPLC are given in text.

ール溶液にした場合、5 µg/ml の濃度である。各標準物質の感度から考慮すれば、定性的には十分確認可能な感度と考えられる。

分析した 20 試料には、これら 16 種の着色剤と一致する UV スペクトル及び保持期間を持つピークを示す試料はなかった。

2. LC/TOF-MS 測定

次に、HPLC 分離条件に準じて LC/TOF-MS での各標準品の測定条件を検討した。ただし、HPLC 装置及びカラムが異なるので、分離条件は若干変更した。その結果、実験の項に示す条件で、16 種の着色剤の相互分離が可能となった。これら 16 種の各着色剤の抽出イオ

ン(Extract Ion)によるクロマトグラム(EIC)を Fig.2 に示す。また、これら着色剤のイオン化した分子の精密質量と検出モードを Table.3 に示す。Acid Red 26 は、negative モードでの検出で、 $[M-2Na]^{2-}$ として検出された。Acid Violet 49 は positive/negative の両モードで検出可能であった。さらに、各色素の 0.02 µg/ml 溶液を 3 µl 注入した時の SNR (Signal to noise ratio) 及び SNR から算出した検出限界値 (S/N=3) も Table 3 に示す。Acid Red26 以外の 15 種の着色剤の検出限界(S/N=3)は、0.62 (Basic Red 9) ～60pg (Disperse Blue 1) と、100 倍の感度の違いがあった。Acid Red 26 は、0.1 µg/ml 溶液で測定しても SNR は 1 より小さく、高濃度溶液 (5

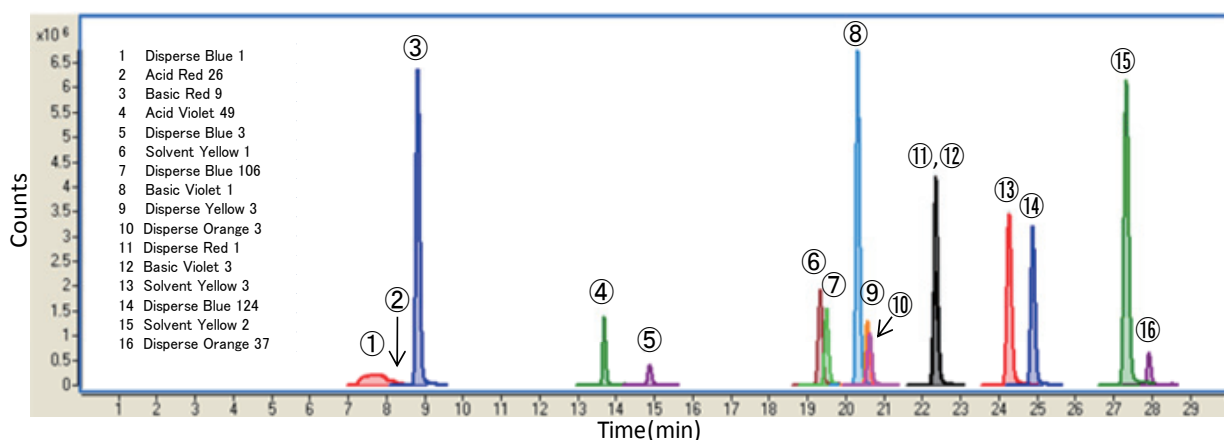


Fig.2 Extracted Ion Chromatogram of 16 Types of Colourants Using Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)
Operating conditions of LC/TOF-MS are given in text.

Table 3 LC/TOF-MS Detection Parameters and Analytical Data for 16 Types of Colourants
Retention time, Accurate mass of ionized molecule, Detection mode, Charge state, SNR (signal to noise ratio)
and Detection limit (signal to noise ratio of 3, S/N=3)

No.	Compounds	Retention Time (min.)	Accurate Mass m/z	Detection Mode	Charge State	SNR ¹	Detection Limit ² (S/N=3)(pg)
1	Disperse Blue 1	7.71	269.10281	Positive	$[M+H]^+$	3	6.00E+01
2	Acid Red 26	8.44	217.01219	Negative	$[M-2Na]^{2-}$	<1	3.00E+03
3	Basic Red 9	8.83	288.15004	Positive	$[M-Cl]^+$	289	6.23E-01
4	Acid Violet 49	13.70	710.23677	Positive	$[M+H]^+$	122	1.48E+00
5	Disperse Blue 3	14.89	297.12480	Positive	$[M+H]^+$	9.7	1.86E+01
6	Solvent Yellow 1	19.33	198.10242	Positive	$[M+H]^+$	56.1	3.21E+00
7	Disperse Blue 106	19.51	336.11265	Positive	$[M+H]^+$	87.7	2.05E+00
8	Basic Violet 1	20.32	358.22815	Positive	$[M+H]^+$	167.1	1.08E+00
9	Disperse Yellow 3	20.58	270.12325	Positive	$[M+H]^+$	30.6	5.88E+00
10	Disperse Orange 3	20.64	243.08780	Positive	$[M+H]^+$	47.1	3.82E+00
11	Disperse Red 1	22.34	315.14550	Positive	$[M+H]^+$	159.9	1.13E+00
12	Basic Violet 3	22.35	372.24421	Positive	$[M-Cl]^+$	122.1	1.47E+00
13	Solvent Yellow 3	24.28	226.13330	Positive	$[M+H]^+$	104.2	1.73E+00
14	Disperse Blue 124	24.90	378.12278	Positive	$[M+H]^+$	222.6	8.09E-01
15	Solvent Yellow 2	27.33	226.13424	Positive	$[M+H]^+$	219.9	8.19E-01
16	Disperse Orange 37	27.93	392.06849	Positive	$[M+H]^+$	9.6	1.88E+01

1: Signal-to-Noise Ratio (20ppb, 3 µl)

2: Detection Limit (Signal-to-Noise Ratio of 3, S/N=3)

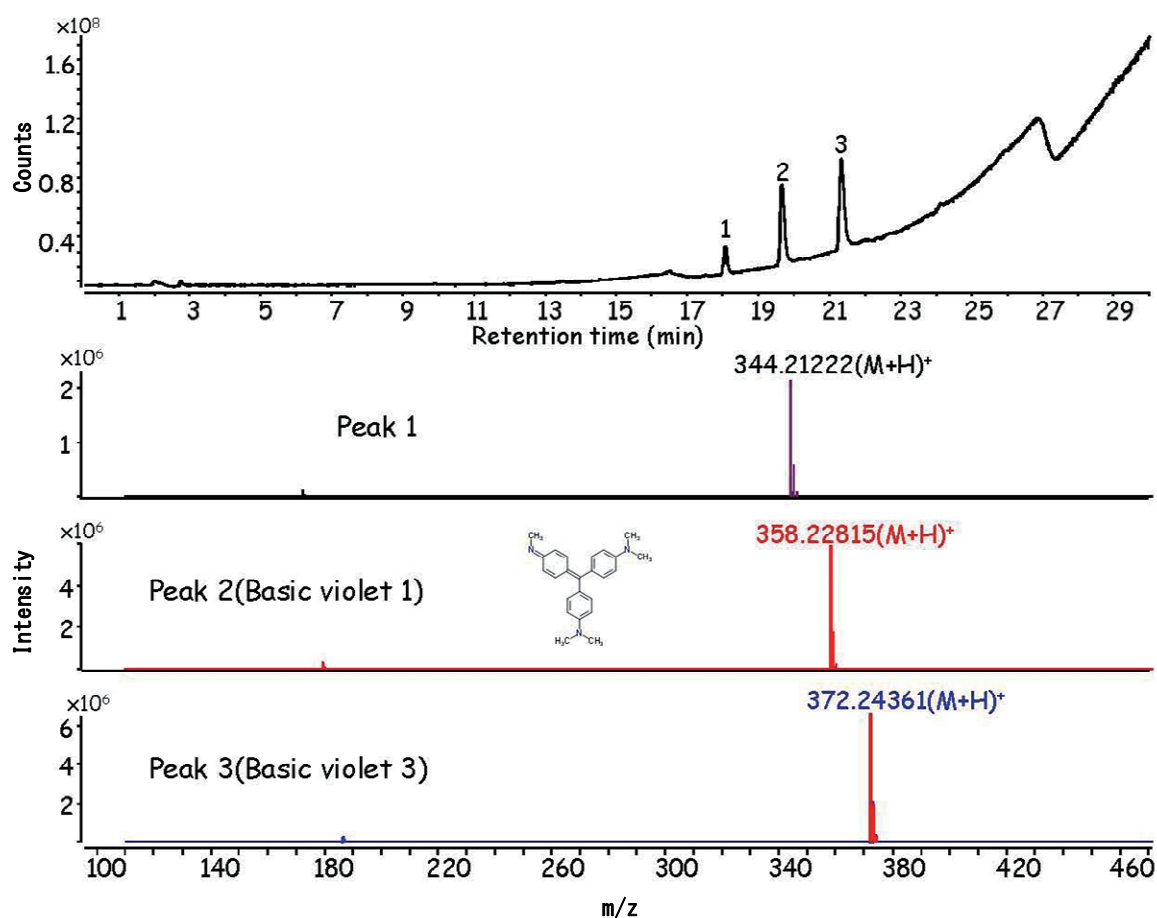


Fig.3 Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of Basic Violet 1 Standard by Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)

μg/ml) で測定した検出限界 (S/N=3) は、3 ng であった。これは、Disperse Blue 1 と比べても、50 分の 1 レベルの低感度であった。しかし、いずれの着色剤も、EN71 の規制限度値(action limit)である 10 μg/g (最終試料溶液量が 1 ml 中の濃度は 5 μg/ml) は、十分測定可能なことが分かった。Acid Red 26 以外のイオンの相対質量誤差は、3.92～3.93 μg/ml の範囲に収まり良好であった (0.02～5 μg/ml 濃度の溶液)。また、これら着色剤の各抽出イオン(Extract Ion)のピーク面積値での検量線(0.02～5 μg/ml)を作成したところ、いずれも R² が 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、これらクロマトグラムの再現性は全て良好であった。

標準品として販売しているが、数種の混合物からなる製品が見うけられた。例えば、Basic Violet 1 は (純度 80%と表示)、主に 3 種の混合からなる商品であった。この標準品の TIC 及び 3 種のマスペクトルを Fig.3 に示す。すなわち、Basic Violet 1、Basic Violet 3

及び [M+H]⁺の質量が 344.212 である質量の 3 物質からなる混合物であることが分かった。

3. LC/MS/MS 測定

さらに、HPLC 分離条件に準じて LC/MS/MS での各標準品の測定条件を検討した。この場合も、HPLC 装置及びカラムが異なるので、分離条件は若干変更した。その結果、実験の項に示す条件で、16 種の着色剤の相互分離が可能となった。Selected Reaction Monitoring 法による SRM クロマトグラムを Fig.4 に示す。検出は、positive/negative モードで行った。各着色剤の親イオン (Precursor ion、m/z)、測定イオン (Target ion、m/z) 及び変換エネルギー (collision energy) を Table.4 に示す。また、1 ng/ml 溶液を 5 μl 注入したときの、SNR (Signal to noise ratio) 及び SNR から算出した検出限界値 (S/N=3) も Table 4 に示す。Acid Red 26 以外の着色剤の検出限界は、S/N=3 として 0.013 (Basic Violet 3)

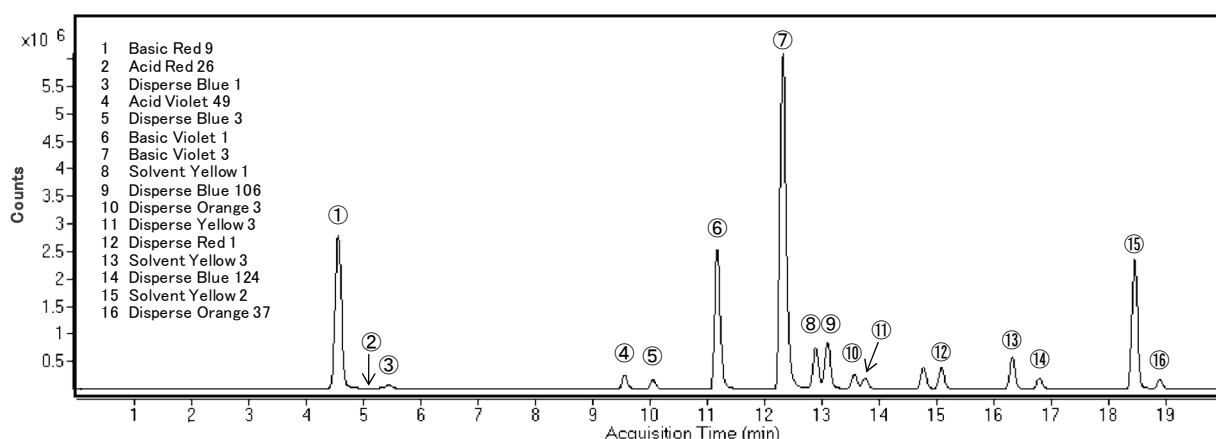


Fig.4 Selected Reaction Monitoring Chromatogram of 16 Types of Colourants Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry(LC/MS/MS)

Operating conditions of LC/MS/MS are given in text.

Table 4 LC/MS/MS Detection Parameters and Analytical Data for 16 Types of Colourants

(Retention time, Precursor ion, Product ion, Collision energy, SNR (signal to noise ratio) and Detection limit (signal to noise ratio of 3, S/N=3))

No.	Compounds	Retention Time (min.)	Detection Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	CE ¹ (eV)	SNR ²	Detection Limit ³ (S/N=3)(pg)
1	Basic Red 9	4.58	positive	288	195	30	428.2	3.50E-02
2	Acid Red 26	5.01	negative	217	137	20	<1	1.00E+02
3	Disperse Blue 1	5.44	positive	268	239	40	12.9	1.16E+00
4	Acid Violet 49	9.56	positive	712	526	55	282.9	5.30E-02
5	Disperse Blue 3	10.05	positive	297	252	15	13.9	1.08E+00
6	Basic Violet 1	11.17	positive	358	342	40	254.9	5.88E-02
7	Basic Violet 3	12.31	positive	372	356	40	1126.9	1.33E-02
8	Solvent Yellow 1	12.89	positive	198	77	20	218.1	6.88E-02
9	Disperse Blue 106	13.09	positive	336	178	15	477.5	3.14E-02
10	Disperse Orange 3	13.56	positive	243	122	15	57.4	2.61E-01
11	Disperse Yellow 3	13.75	positive	270	107	25	16.6	9.04E-01
12	Disperse Red 1	15.08	positive	315	134	25	81.5	1.84E-01
13	Solvent Yellow 3	16.32	positive	226	91	20	148.9	1.01E-01
14	Disperse Blue 124	16.79	positive	378	220	6	150.6	9.96E-02
15	Solvent Yellow 2	18.45	positive	226	77	20	835.1	1.80E-02
16	Disperse Orange 37	18.89	positive	392	351	20	7.7	1.95E+00

1: Collision Energy

2: Signal-to-Noise Ratio (1ppb, 5 μ l)

3: Detection Limit (Signal-to-Noise Ratio of 3, S/N=3)

～1.9 pg (Disperse Orange 37) であり、LC/TOF-MS の場合と同様に、着色剤によって 100 倍程度の感度の違いが見られた。しかし、LC/TOF-MS よりは、30～50 倍ほど高感度であった。negative モードで測定した Acid Red 26 の感度は低く、SNR は 1 より小さく、1 μ g/ml で測定した検出限界 (S/N=3) は、0.1 ng であった。これは、Disperse Orange 37 の 50 分の 1 の低感度であった。それでも、EN71 の規制限度値(action limit) である 10 μ g/g (最終試料溶液量を 1ml として濃度は 5 μ g/ml) は、十分測定可能である。使用装置、条件は異なるものの、Acid Red 26 を negative モードで測定した報告がある^{12,13)}。この報告では、positive モードで測定した Disperse Blue 1 よりやや高い感度が得られてい

る。今後、異なる機種でも検出を試みる予定である。各着色剤の SRM イオンのピーク面積値での検量線(1～1000 ng/ml)を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、これらクロマトグラムの再現性は全て良好であった。

4. 市販製品の分析

我々は既に市販の乳幼児用衣服 7 製品(8 部位)、繊維製玩具 5 製品 (12 部位) の 20 試料に対して、HPLC-DAD による定性、半定量試験を行った。その結果、分析した製品からは、どの着色剤も検出しなかったことを報告した¹¹⁾。今回検討した LC/MS に導入するための移動相条件 (酢酸アンモニウムとギ酸の水溶液及び

アセトニトリル混液)で、同一製品を分析したところ、やはり、16種の着色剤とUVスペクトル及び保持期間が共に一致するピークを示す試料はなかった。

次に、これら製品に、LC/MS/MS法及びLC/TOF-MS法による測定を行った。まず、LC/TOF-MSによる測定で構造解析を行ったところ、2試料から微量のDisperse Orange 3とDisperse Orange 37が検出された。試料No.13からDisperse Orange 3が、試料No.18からはDisperse Orange 37が検出された。その抽出イオンクロマトグラム(EIC)及びスペクトルをFig.5に示す。さらに、LC/MS/MSによる測定・定量を行い、やはり前

述の2試料からDisperse Orange 3とDisperse Orange 37が検出された。そのSRMクロマトグラムをFig.6に示す。検出した値は、試料No.13から検出されたDisperse Orange 3が74.2 ng/g(溶液量1 ml、濃度37.1 ppb)、試料No.18からのDisperse Orange 37が112.2 ng/g(溶液量1 ml、濃度56.1 ppb)であった。この値は、EN71の規制限度値(action limit)である10 µg/g(最終試料溶液量が1 mlとして5 µg/mlの濃度)と比較すれば、はるかに低濃度である。従って、最終的判定方法として、今回検討したLC/TOF-MS、LC/MS/MS共に、十分適用可能な測定法であることが分かった。

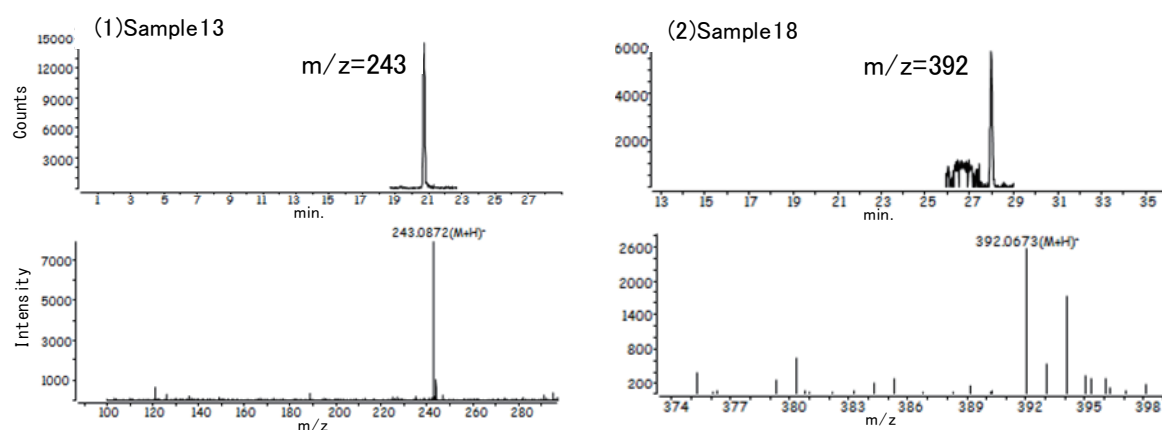


Fig.5 Extracted Ion Chromatograms and Mass Spectra of Disperse Orange 3 from Sample 13 and Disperse Orange 37 from Sample 18 Using Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)
(1) Sample 13 : Disperse Orange 3 was Detected (20.7 min.), (2) Sample 18 : Disperse Orange 37 was Detected (28 min.)

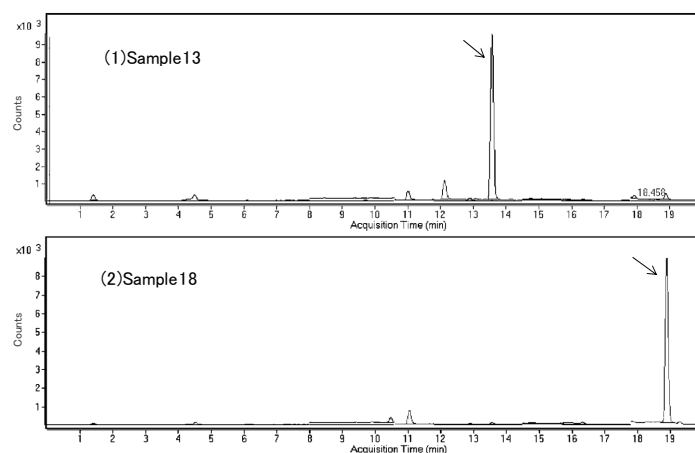


Fig.6 Selected Reaction Monitoring Chromatograms of Disperse Orange 3 from Sample 13 and Disperse Orange 37 from Sample 18 by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry(LC/MS/MS)
(1) Sample 13 : Disperse Orange 3 was Detected (m/z=122, 13.6 min.),
(2) Sample 18 : Disperse Orange 37 was Detected (m/z= 351, 18.9 min.)

まとめ

我々は、欧州規格 EN71「玩具の安全性規制」の中で、繊維製玩具に対し規制されている 16 種の着色剤の試験法について再検討と改良を行っている。既に、最終試験法の第一段階である HPLC-DAD による分析法を検討し、結果を報告した。今回まず、最終試験法の第二段階である LC/MS 導入のために、HPLC 分離条件の検討を行い、移動相に酢酸アンモニウムとギ酸水溶液／アセトニトリル混液を用いて、ODS カラムによる 16 種の着色剤の相互分離を可能とした。

次に、LC/TOF-MS による測定法（positive/negative）を検討した。positive モード測定で 15 種の着色剤の抽出イオン（EI）による検出限界は、S/N=3 として 0.62

（Basic Red 9）～60 pg（Disperse Blue 1）であり、着色剤によって 100 倍の感度の違いがあった。negative モード測定で Acid Red 26 は Disperse Blue 1 に比べて 50 分の 1 の低感度であった（S/N=3 として 3ng）。各着色剤の抽出イオンのピーク面積値での検量線（0.02～5 µg/ml）は、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。

さらに、LC/MS/MS による測定法を検討した。positive モード測定で 15 種の着色剤の SRM イオンでの検出限界は、S/N=3 として 0.013（Basic Violet 3）～1.9pg（Disperse Orange 37）であり、着色剤によって 100 倍以上の感度の違いがあった。ここでも negative モード測定で Acid Red 26 は Disperse Orange 37 より 50 分の 1 以下の低感度であった（S/N=3 として 0.1ng）。しかし、いずれも LC/TOF-MS よりは、30～50 倍ほど高感度であった。各着色剤の SRM イオンのピーク面積値での検量線（1～1000ng/ml）を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。

前報 HPLC-DAD での分析調査に用いた市販乳幼児繊維製品（玩具、衣服）を、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS で分析した。その結果、低濃度ではあるが、1 試料から 74.2 ng/g（試料溶液量 1ml、濃度 37.1ppb）の Disperse Orange 3 が、1 試料から 112.2 ng/g（試料溶液量 1ml、濃度 56.1ppb）の Disperse Orange 37 が検出された。この値は、EN71 の規制限度値（Action limit）である 10µg/g（最終試料溶液量が 1ml として 5µg/ml の濃度）と比較すれば、はるかに低濃度である。従って、最終的判定方法としては、LC/TOF-MS、LC/MS/MS 共に、十分適

用可能な測定法であることが分かった。

LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS での測定に際し、ご協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社の滝埜昌彦博士に深謝いたします。

文 献

- 1) エコテックスについて、(財)日本染色検査協会 エコテックス事業所発行・編、東京(2004)
- 2) 河村葉子, 高野忠夫, 津田 博:「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」, 平成 17 年度厚生労働科学研究分担研究報告書（食品の安心・安全確保推進研究事業）
- 3) 小瀬達夫, 岡田弘毅: 平成 17 年度厚生労働科学研究「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」付属文書（欧州規格 EN 71-10 及び EN-11 最終原案）, pp160-208
- 4) (財)日本規格協会: 染色堅ろう度試験方法通則 JIS L 0801:2004, 東京(2004)
- 5) (財)日本規格協会: 汗に対する染色堅ろう度試験法 JIS L 0848:2004, 東京(2004)
- 6) (財)日本規格協会: 計器による変退色及び汚染の判定方法 JIS L 0809:200, 東京(2001)
- 7) (財)日本規格協会: 歯科用金属材料の腐食試験方法 JIS T 6002:2005, 東京(2005)
- 8) 中島晴信, 高塚 正, 鹿庭正昭: 人工汗・唾液による乳幼児繊維製品（玩具及び衣類）からの染料成分の溶出挙動, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 46, 97-102(2008)
- 9) 中島晴信, 鹿庭正昭: 乳幼児繊維製品（玩具及び衣服）に使用されている染料成分中の芳香族第一アミン類の分析調査, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 47, 75-80(2009)
- 10) Kawakami T, Isama K, Nakashima H, Tsuchiya T and Matsuoka A: Analysis of primary aromatic amines originated from azo dyes in commercial textile products in Japan, J. Environ. Sci. Health Part A, 45, 1281-1295(2010)
- 11) 中島晴信, 山崎勝弘, 深谷 崇, 鹿庭正昭: 乳幼児繊維製品（玩具及び衣服）に規制されている 16 種の着色剤の分析調査, 大阪府立公衆衛生研究所

報告, 48, 65-69(2010)

- 12) Ding Y, Cao X, Wu L and Zhang Q: Fast separation and identification of nine carcinogenic dyes in textiles using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Chinese Journal of chromatography, 26(5), 603-605(2008)
- 13) Ding Y, Sun C and Xu X: Simultaneous identification of nine carcinogenic dyes from textiles by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry via negative/positive ion switching mode, Eur.J.Mass Spectrom., 15, 705-713(2009)