

【調査研究】

繊維製品に含まれるアゾ化合物由来の特定芳香族アミン類試験法の検討（第2報）

Study of the testing method of specific aromatic amines derived from azo compounds contained in textile products (2)

金子英史, 難波順子, 繁田典子, 浦山豊弘, 池田和美, 吉岡敏行

KANEKO Hidefumi, NAMBA Junko, SHIGETA Noriko, URAYAMA Toyohiro, IKEDA Kazumi,
YOSHIOKA Toshiyuki

要 旨

分散染料が使用されていない繊維製品を対象とした特定芳香族アミン類の計26物質について、前処理法及び確認試験を検討した。繊維製品を用いず添加回収試験を実施したところ、溶媒の流下速度を70滴/min (900 µL/min) 以下にすることにより、JIS L 1940-1で回収率の目標値が設定されている20物質全ての目標値を達成した。しかし、繊維製品を用いた添加回収試験では、カラム溶出溶媒量を増やしても、3物質がJIS L 1940-1の回収率の目標値を満たさなかった。また、HPLCの確認試験において、ピークが重なり分離及び確認が難しい物質が2物質あった。繊維製品を用いた場合の回収率の向上、及び確認試験での条件を今後検討していくこととする。

[キーワード：アゾ化合物, 特定芳香族アミン, 家庭用品, GC-MS]

[Key words : Azo compounds, Specific aromatic amines, Household products, GC-MS]

1 はじめに

アゾ染料は、繊維製品や革製品の染色に使用される合成染料の1つであり、世界で3000種類以上が広く使用されている。アゾ染料は、その化学構造中にアゾ結合(-N=N-)を有しており、腸内の細菌、肝臓等で還元分解され、芳香族アミンを生成する。

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第2条第2項の物質を定める政令（以下「政令」という。）が平成27年に一部改正され、芳香族アミンのうち、発がん性又はそのおそれが指摘されている24種類（以下「特定芳香族アミン」という。）が、新たに政令に指定された。このことから本県においてもアゾ染料を含む製品の検査体制を整えるための検討を行っている。

公定法は、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年厚生省令第34号。）別表第1に示されているが、試験実施に当たっては、JIS L 1940-1¹⁾（以下「JIS」という。）を参考に、特定芳香族アミンの回収率試験を予め実施し、JISに規定されている回収率を満たしていることを確認するなど、試験操作手順を確認することが求められている。

本報では、水酸化ナトリウム濃度、MTBEの量はJISから変更することなく操作手順の改良による回収率の向上を検討した。またGC-MS及びHPLCを用いた確認試

験についても分離状況を検証したので、その結果を報告する。

2 方法

2.1 試薬、標準品及び試験溶液調整方法

既報²⁾のとおり。なお、内部標準液添加量は、法施行規則のとおり50 µLに変更した。

2.2 装置及び測定条件

装置：ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)：既報²⁾のとおり

高速液体クロマトグラフ (HPLC)：日本ウォーターズ製 Alliance2695

GC/MS測定条件：既報²⁾のとおり

HPLC測定条件：表1のとおり

2.3 添加回収試験

繊維製品を用いず、標準品をクエン酸緩衝液に添加して回収率を求める方法（以下「添加回収試験1」という。）、及び繊維製品を用いた添加回収試験（以下「添加回収試験2」という。）の検討を行った。

2.3.1 添加回収試験1

添加量は10 µL/mL、最終液量は5 mL、測定溶液中濃度は2 µL/mLとし、5回の併行試験を行った。あらかじめ加温したクエン酸緩衝液15 mLにメタノール2 mL

を加えた溶液に添加用標準混合液を添加し、既報²⁾に示した秤量後の操作を行った。

2.3.2 添加回収試験2

分散染料が使用されていない繊維製品（綿無着色）1.0 gを試料に用いた。添加量は10 µL/g、最終液量は10 mL、測定溶液中濃度は1 µg/mLとし、2回の併行試験を行った。試料に添加用標準混合液を添加し、あらかじめ加温したクエン酸緩衝液15 mLとメタノール2 mLを加えて、既報²⁾に示した秤量後の操作を行った。

3 結果及び考察

3.1 添加回収試験1

既報²⁾においてJISで規定する回収率を達成しなかった物質（2,4-diaminoanisole (No.12), 4,4'-diaminodiphenylether (No.17), 4,4'-methylenedianiline (No.18), benzidine (No.19), 4,4'-diaminodiphenylsulphide (No.23), 3,3'-dichlorobenzidine (No.24), 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane (No.25))があったため、クエン酸緩衝液の温度及び溶媒の流下速度の検討を行った。

まず、クエン酸緩衝液の温度低下による影響を確認す

るため、70 °Cに加温したクエン酸緩衝液を反応容器に加え、70 °Cの水浴中で一定時間加温後、水浴中の反応容器にメタノール及び添加用混合標準溶液を加えた場合の回収率と水浴外で同様の操作を行った場合の回収率を比較した。その結果を表2に示す。反応容器の温度を70 °Cに保つことによる回収率の向上は見られず、回収率に影響を与える要因は他にありと考えられた。

次に、溶媒の流下速度による影響を確認するため、流下速度による回収率の比較を行った。その結果を表3に示す。溶媒の流下速度が回収率に大きく影響していた。溶出速度は、味村ら³⁾の報告を参考に75滴/minより少し遅い70滴/minとした。70滴/min以下では、全ての物質の回収率がJISで規定する回収率を達成したのに対して、70滴/min超では、2,4-diaminoanisole (No.12), 4,4'-diaminodiphenylether (No.17), 4,4'-methylenedianiline (No.18), benzidine (No.19), 4,4'-diaminodiphenylsulphide (No.23)がJISで規定する回収率を満たさなかった。溶媒の流下速度が速すぎるとカラムから十分に溶出できず回収率が低下したと考えられたため、以下の検討は70滴/min以下で行った。

表1 HPLC 測定条件

カラム	Agilent 製 Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6mm φ×150mm,3.5µm)
カラム温度	32°C
検出器	PDA
波長	240, 280, 305, 380nm
注入量	5 µL
移動相 A	リン酸二水素カリウム 0.68g を水に溶解し 1000mL とし、これにメタノール 150mL を加 えたもの
移動相 B	メタノール

移動相割合

時間(分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0~27.5	100→5	0→95
27.5~30.0	5	95
30.0~30.5	5→100	95→0
30.5~40.0	100	0

流速

時間(分)	流速(mL/min)
0~27.5	0.6
27.5~30.0	0.6→2
30.0~31.5	2→0.6
31.5~40.0	0.6

表2 添加回収試験1 クエン酸温度比較結果

No.	物質名	回収率(%)		JIS回収率 (%)
		水浴外の 反応容器 に添加	水浴中の 反応容器 に添加	
1	aniline	115	111	70
2	o-toluidine	117	109	50
3	2,4-dimethylaniline			
4	2,6-dimethylaniline	86	79	-
5	o-anisidine	89	81	70
6	p-chloroaniline	90	84	70
7	2-methoxy-5-methylaniline	88	80	70
8	2,4,5-trimethylaniline	89	79	70
9	4-chloro-2-methylaniline	90	81	70
10	1,4-phenyldiamine	6	0	-
11	2,4-diaminotoluene	57	42	50
12	2,4-diaminoanisole	11	13	20
13	2-naphthylamine	76	74	70
14	2-methyl-5-nitroaniline	0	0	-
15	4-aminobiphenyl	103	82	70
16	p-phenylazoaniline	2	3	-
17	4,4'-diaminodiphenylether	57	54	70
18	4,4'-methylenedianiline	74	62	70
19	benzidine	71	62	70
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	3	3	-
21	4,4'-diamino-3,3'- dimethyldiphenylmethane	84	73	70
22	3,3'-dimethylbenzidine	85	76	70
23	4,4'-diaminodiphenylsulphide	72	55	70
24	3,3'-dichlorobenzidine	95	80	70
25	3,3'-dichloro-4,4'- diaminodiphenylmethane	94	82	70
26	3,3'-dimethoxybenzidine	89	78	70
未達成				

表3 添加回収試験1 溶出速度比較結果

No.	物質名	回収率(%) (n=5)		JIS回収率 (%)
		溶出速度 70滴/min 以上	溶出速度 70滴/min 以下	
1	aniline	113	124	70
2	o-toluidine	112	122	50
3	2,4-dimethylaniline			
4	2,6-dimethylaniline	80	91	-
5	o-anisidine	82	90	70
6	p-chloroaniline	85	94	70
7	2-methoxy-5-methylaniline	82	91	70
8	2,4,5-trimethylaniline	81	93	70
9	4-chloro-2-methylaniline	82	97	70
10	1,4-phenyldiamine	0	0	-
11	2,4-diaminotoluene	51	98	50
12	2,4-diaminoanisole	14	29	20
13	2-naphthylamine	73	92	70
14	2-methyl-5-nitroaniline	0	0	-
15	4-aminobiphenyl	84	97	70
16	p-phenylazoaniline	3	0	-
17	4,4'-diaminodiphenylether	57	75	70
18	4,4'-methylenedianiline	63	77	70
19	benzidine	66	74	70
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	3	0	-
21	4,4'-diamino-3,3'- dimethyldiphenylmethane	75	95	70
22	3,3'-dimethylbenzidine	78	91	70
23	4,4'-diaminodiphenylsulphide	61	71	70
24	3,3'-dichlorobenzidine	84	95	70
25	3,3'-dichloro-4,4'- diaminodiphenylmethane	82	96	70
26	3,3'-dimethoxybenzidine	86	87	70
未達成				

3.2 添加回収試験2

結果を表4に示す。4,4'-diaminodiphenylether(No.17), 4,4'-methylenedianiline (No.18), benzidine (No.19), 4,4'-diaminodiphenylsulphyde (No.23), 3,3'-dichlorobenzidine (No.24), 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane (No.25) が, JISで規定する回収率を満たさなかった。カラムからの溶出溶媒である MTBEを80 mLから90 mLに変更し, 再試験を実施したところ, 4,4'-diaminodiphenylether (No.17), 4,4'-methylenedianiline (No.18), benzidine (No.19) のみが目標値を満たさなかった。これらの3物質は, 溶出速度が70滴/min超の場合でも溶出が悪い物質であり, カラムに吸着しやすく, カラムから完全に溶出させることが難しいことが推測される。今後, 更に溶出速度を低下させる等の検討を行うこととする。

3.3 確認試験

3.3.1 GC/MS試験法

標準品のScan測定のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を図1に示す。添加回収試験2に用いた検体をScan測定したところ, 1,4-phenylenediamine (No.10), 2,4-diaminoanisole (No.12), 2-methyl-5-nitroaniline (No.14), p-phenylazoaniline (No.16), 2-methyl-4-(2-tolylazo) aniline (No.20) 以外の物質は標準品のマススペクトルと一致することが確認できた。確認できない2,4-diaminoanisole (No.12) は回収率が20%程度(JISで規定する回収率が20%)であり, 検体に基準値濃度である30 µg/mLが含まれている場合における前処理での回収率が悪い場合のためScan測定では感度不足となり, マススペクトルの一致を確認することが困難であった。今後

表4 添加回収試験2 結果

No.	物質名	回収率(%) (n=2) 溶出速度 70滴/min以下		JIS回収率 (%)
		MTBE 80mL	MTBE 90mL	
1	aniline	116	119	70
2	o-toluidine	117	119	50
3	2,4-dimethylaniline	87	90	-
4	2,6-dimethylaniline			
5	o-anisidine	87	91	70
6	p-chloroaniline	85	92	70
7	2-methoxy-5-methylaniline	89	92	70
8	2,4,5-trimethylaniline	88	91	70
9	4-chloro-2-methylaniline	80	90	70
10	1,4-phenylenediamine	27	32	-
11	2,4-diaminotoluene	75	77	50
12	2,4-diaminoanisole	21	21	20
13	2-naphthylamine	73	80	70
14	2-methyl-5-nitroaniline	0	0	-
15	4-aminobiphenyl	80	92	70
16	p-phenylazoaniline	0	0	-
17	4,4'-diaminodiphenylether	53	54	70
18	4,4'-methylenedianiline	53	53	70
19	benzidine	56	59	70
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	0	0	-
21	4,4'-diamino-3,3'- dimethyldiphenylmethane	71	73	70
22	3,3'-dimethylbenzidine	70	74	70
23	4,4'-diaminodiphenylsulphyde	65	70	70
24	3,3'-dichlorobenzidine	56	74	70
25	3,3'-dichloro-4,4'- diaminodiphenylmethane	66	77	70
26	3,3'-dimethoxybenzidine	79	84	70

未達成

は、測定溶液の濃縮等の検討が必要と考えられる。次に、1,4-phenylenediamine (No.10) は、既報^{4),5)}でもほとんど検出されておらず、前処理の操作で分解されている可能性が高いと考えられた。また、2-methyl-5-nitroaniline (No.14)、p-phenylazoaniline (No.16)、2-methyl-4-(2-tolylazo) aniline (No.20) は、JISで回収率が定められていない物質であり、前処理で還元され分解されるため検出されないと推測される。なお、標準品を添加していない検体を前処理した後、基準値になるように標準品を添加後Scan測定したところ、全ての物質で標準品のマススペクトルと一致することが確認できた。

3.3.2 HPLC 試験法

測定条件は表1のとおり設定した。標準品のクロマトグラムを図2に示す。2-methoxy-5-methylaniline (No.7)

と3,3'-dimethylbenzidine (No.22)、2,4-dimethylaniline (No.3)と2,6-dimethylaniline (No.4)、2,4,5-trimethylaniline (No.8)と4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane (No.21) はピークが分離しなかった。保持時間を前後に動かして吸収スペクトルを確認したところ、2-methoxy-5-methylaniline (No.7)と3,3'-dimethylbenzidine (No.22)、2,4,5-trimethylaniline (No.8)と4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane (No.21) はそれぞれ確認できた。2,4-dimethylaniline (No.3)と2,6-dimethylaniline (No.4) は、メチル基1個のみが異なる構造異性体であり、クロマトグラム上での分離が困難な上に、スペクトルも相同性が高く、確認が難しかった。今後、移動相の割合及び流速条件を変更する等、ピーク分離のための検討を行うこととする。

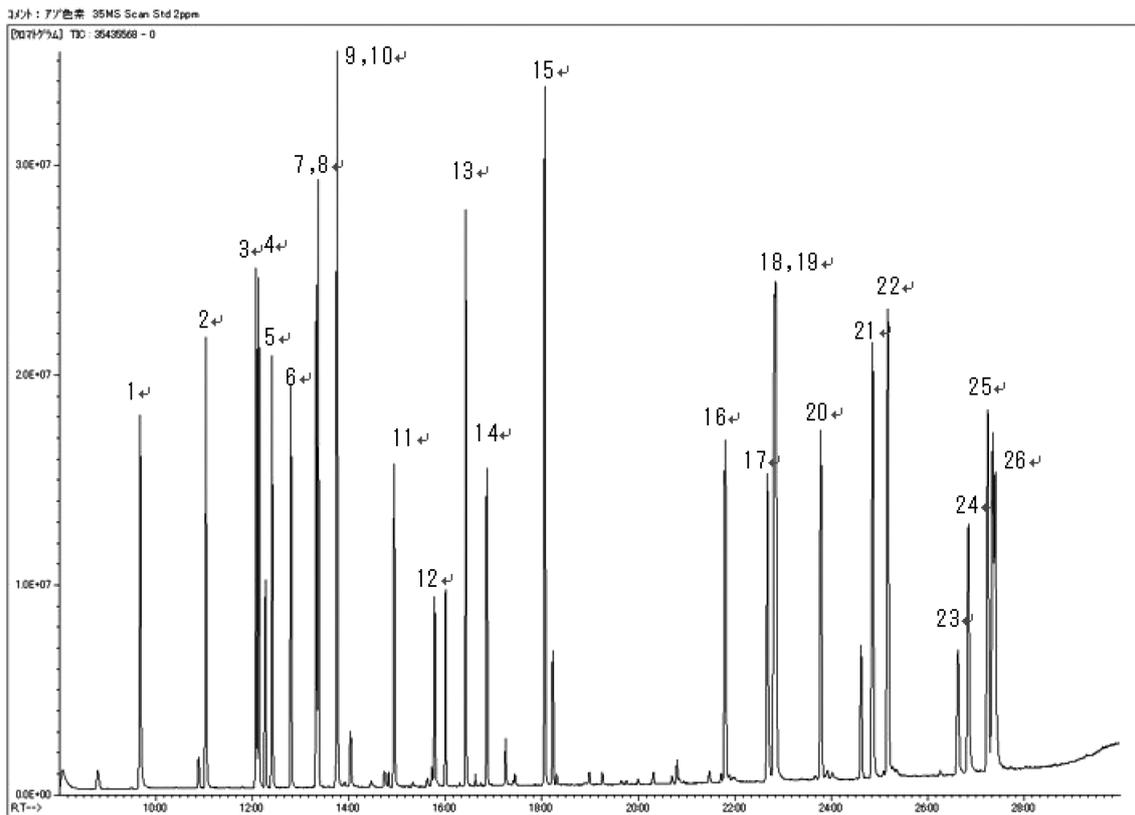


図1 2 µg/mL 混合標準液のGC/MS クロマトグラム (TIC)

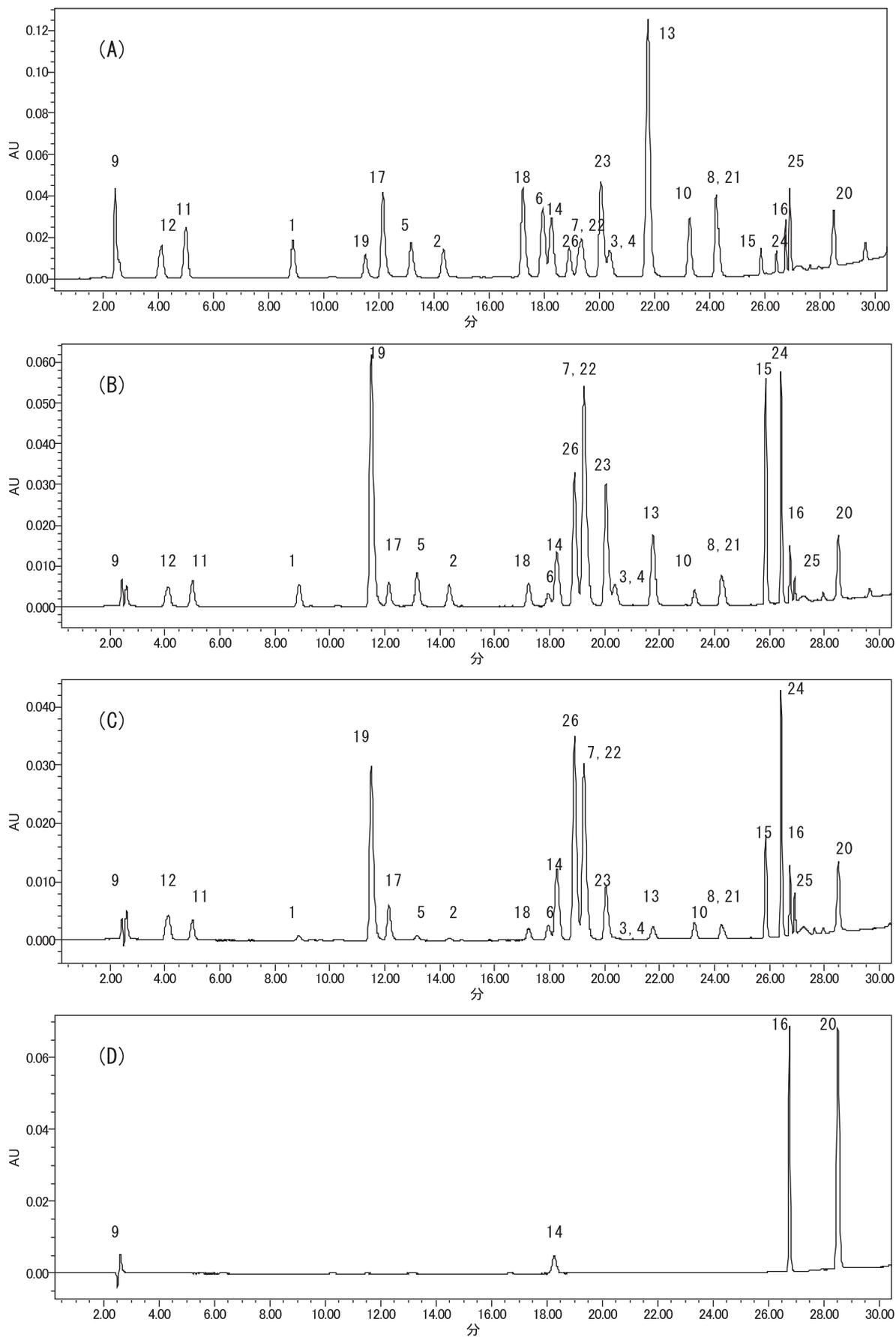


図2 10 μg/mL 混合標準液のHPLC クロマトグラム (A:240 nm , B:280 nm , C:305 nm , D:380 nm)

4 まとめ

繊維製品を用いない添加回収試験では、カラムからの溶出速度を70滴/min (900 µL/min) 以下にすることにより、JISで規定されている回収率を20物質全てで達成した。しかし、繊維製品を用いた添加回収試験では、6物質がJISの目標値を満たさず、カラムからの溶出溶媒を増やしても、3物質が目標値を満たさなかった。また、HPLCの確認試験において、ピークが重なり分離及び確認が十分でない物質が2物質あった。今後、前処理法の検討による回収率の向上、及び確認試験での全ピークの同定が可能になるよう、検討していくこととする。

文 献

- 1) JIS L 1940-1 : 2019繊維製品-アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法
- 2) 金子英史, 難波順子, 林 隆義, 筒井みちよ, 池田和美ら: 繊維製品に含まれるアゾ化合物由来の特定芳香族アミン類試験法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 43, 125-133, 2019
- 3) 味村真弓, 小泉義彦, 大山正幸, 吉田俊明: アゾ染料に由来する2種の特定芳香族アミンの分析における回収率の検討, 大阪健康安全基盤研究所年報, 1, 85-92, 2017
- 4) 大家寿彦: 家庭用品のアゾ化合物の試験調査, 横須賀市健康安全科学センター年報, 19, 37-51, 2016
- 5) 衛藤加奈子, 御手洗広子, 嶋崎みゆき, 鈴木弘続, 伊東達也: 新規指定有害物質「アゾ化合物」の測定方法の検討, 大分県衛生環境研究センター年報, 45, 37-41, 2017
- 6) 河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明: 繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の高速液体クロマトグラフィーを用いた確認試験に関する検討, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132, 57-66, 2014