〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
33 (2) 90-97 (1987)

高速液体クロマトグラフィーによるポリ塩化ビニル製品中の無水フタル酸の定量

五十嵐良明, 小嶋茂雄, 鹿庭正昭, 中村晃忠

国立衛生試験所

Determination of Phthalic Anhydride in Poly (vinyl chloride) Products by High Performance Liquid Chromatography

YOSHIAKI IKARASHI, SHIGEO KOJIMA, MASA-AKI KANIWA
and AKITADA NAKAMURA

National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

(Received August 7, 1986)

A method for the determination of phthalic anhydride (PA) in poly (vinyl chloride) (PVC) products by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) is described. By the reaction of PA with ethanol, PA is converted to monoethyl phthalate (MoEP), which is further methylated to methyl ethyl phthalate (MEP) with diazomethane. PA could be successfully determined by quantitating MEP.

The method is as follows: one gram of chopped PVC sample and 10 mg of Ca, Zn stearate are dissolved in 10 ml of dehydrated tetrahydrofuran. Ten milliliter of ethanol is added to the solution, and the solution is refluxed for 20 min (PA→MoEP). PVC polymer is precipitated by the addition of methanol, and removed by filtration. After shaking the filtrate with cation-exchange resin, MoEP is methylated with diazomethane (MoEP→MEP). The reaction mixture is loaded on a silica gel column, and washed with 50 ml of diethyl ether-hexane (5:95) mixture, and eluted with 50 ml of diethyl ether-hexane (10:90) mixture. The eluate is evaporated to dryness, and the residue is re-dissolved in 1 ml of methanol. Five microliter of this solution is injected to HPLC apparatus. HPLC conditions: column, Nucleosil 5 C₈ (250 mm×4.6 mm i.d.); mobile phase, acetonitrile-water (60:40); flow rate, 1.0 ml/min; detector, ultraviolet detector; detection wavelength, 254 nm.

Calibration curve based on the peak height of MEP was found to be linear in a wide range of 2—1000 µg of PA. However, the amounts of PA found in PVC products were only less than 2.6 µg/g.

Keywords—determination; phthalic anhydride; poly(vinyl chloride) product; derivatization; methyl ethyl phthalate; HPLC

緒 言

無水フタル酸 (PA) は反応性が高く, 皮膚や上気道を刺激するため, PA を取り扱う職場において PA による皮膚炎¹⁾ や気管支喘息^{2,3)} の発生が報告されている. 最近, 道祖土ら⁴⁾ は軟質ポリ塩化ビニル (PVC) 製品中から 0.7% の PA を検出したと報告している. 著者らはこの報告に注目し, このように多量の PA が PVC 製品中に含まれているとすれば, 家庭用手袋によるかぶれ⁵⁾ など PVC 製品による事故が PA によって起こっている

可能性があり, 市販の PVC 製品中の PA の含有量を把握する必要があると考えた.

PA は反応性の高い不安定な化合物であり, その正確な定量は難しい. 道祖土ら⁴⁾ は PVC 中の PA を安定な誘導体に変換することなくそのままガスクロマトグラフィー (GC) により定量する方法をとっているが, 著者らが追試したところでは, 前処理の段階で PA がメタノールと反応してロスするため, 低い回収率しか得ることができなかった.

一方、PA を安定な誘導体に変換して定量する方法としては、アルキド樹脂中の PA をフタル酸に変換後、水酸化カリウムにより滴定する方法⁶⁾ や PA を硫酸酸性のエタノールでフタル酸ジエチル (DEP) に変換後、GC で分析する方法⁷⁾ がある。しかしながら、PVC 製品中には DEP やフタル酸が可塑剤 (あるいは他の可塑剤中の不純物) やその分解生成物として含まれている可能性があるため、PA をこれらの化合物に変換して分析するのは適切な方法とはいえない。

そこで著者らは、PA をエタノールと反応させてフタル酸モノエチル (MoEP) とし、更にこれをジアゾメタンによりメチル化して通常は PVC 製品中に含まれることのないフタル酸メチルエチル (MEP) に変換して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量する方法を確立し、市販の PVC 製品の分析にも応用した。

実験方法

1. 試料 市販軟質 PVC 製品 9 種 (Table II)。

2. 試薬 無水フタル酸 (PA) 標準液——和光純薬工業製の特級品をアセトンに溶かし、必要な濃度の溶液を調製して用いた。

フタル酸メチルエチル (MEP) 標準液——フタル酸モノエチル (MoEP; 和光純薬工業製の特級品) をジアゾメタンでメチル化したものをメタノールに溶かし、1 mg/ml の濃度の溶液を調製し、適宜希釈して用いた。

フタル酸エステル類——フタル酸ジメチル (DMP), DEP, フタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) 並びにフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) はいずれも東京化成製の特級品を用いた。

ステアリン酸カルシウム・亜鉛 (ステアリン酸 Ca, Zn)——テルモ社製の PVC フィルム用安定剤; エポキシ化大豆油中にステアリン酸亜鉛を 10.16%, ステアリン酸カルシウムを 7.58% 含む。

テトラヒドロフラン (THF)——和光純薬工業製の特級品に水素化カルシウムを加え、24時間放置して脱水した後、蒸留して 66°C で留出する留分をとり、無水硫酸ナトリウムを加えて密栓して保存したもの。

アセトニトリル——和光純薬工業製の高速液体クロマトグラフィー用。

陽イオン交換樹脂——ロームアンドハース社製 Amberlyst (非水系用)。

シリカゲル——Merck 社製 Kieselgel 60 (70—230 mesh)。

他の試薬はいずれも市販の特級品を用いた。

3. 装置及び器具 高速液体クロマトグラフ——島津 LC-3 A 型に島津 SPD-2 A 型紫外検出器を接続し

て用いた。

クロマト管——内径 10 mm, 長さ 30 cm の活栓付きガラス製クロマト管。

マイクロシリンジ——Hamilton 社製, 25 μ l 用。

4. HPLC 条件 カラム: Nucleosil 5 C₈ カラム (Nagel 社製, 粒径 5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); 移動相: アセトニトリル-水 (60:40); 流速: 1.0 ml/min; 測定波長: 254 nm。

5. 定量法 標準添加法による操作について記す。

5-1 試験溶液の調製——PVC 製品を細切し、5 個の 50 ml のナス型フラスコに 1.00 g ずつ精秤して入れる。これらのナス型フラスコにそれぞれ 0 (無添加), 2, 5, 8 及び 12 μ g の PA を加え、更にステアリン酸 Ca, Zn 各 10 mg 及び THF 各 10 ml を加えて、マグネチックスターラーで 1 時間かき混ぜて PVC を溶かす。得られた溶液にエタノール 10 ml を加え、20 分間加熱・還流する (PA $\rightarrow$ MoEP)。反応液にメタノール 10 ml を加えて PVC を析出させ、ろ過して除く。ろ液に Amberlyst 3 g を加えて 30 分間振り混ぜた後、ろ過して溶媒を留去する。残留物を酢酸エチル 1 ml に溶かし、常法により調製したジアゾメタン・ジエチルエーテル溶液 1 ml を加えて 30 分間放置する (MoEP $\rightarrow$ MEP)。溶媒を留去し、残留物をジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液 2 ml に溶かして、シリカゲルカラム (シリカゲル 4 g をジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液を用いて湿式法によりクロマト管に充填したもの) に負荷する。まずジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液 50 ml で洗浄し、次にジエチルエーテル-ヘキサン (10:90) 混液 50 ml を通して、溶離液を分取する。溶離液から溶媒を留去し、残留物をメタノール 1 ml に溶かして試験溶液とする。操作法を Chart 1 に示した。

5-2 定量操作——得られた 5 種の試験溶液からマイクロシリンジにより各 5 μ l を採り、HPLC 装置に注入する。得られたクロマトグラム上の MEP のピーク高さを縦軸に、PA 添加量を横軸にとりグラフ上にプロットし、最小二乗法により得られた回帰直線と横軸の交点から試料中の PA 量を求める。

結果及び考察

1. MEP と他のフタル酸エステル類との分離

通常 MEP は PVC 製品中に含まれておらず、PVC 製品中の PA を定量するのに適した誘導体と考えられる。

そこで、MEP, DMP, DEP, DBP, 及び DEHP の 5 種のフタル酸エステルを用いて分離条件を検討した。その結果、本法の HPLC 条件で MEP が DMP や DEP

Chart 1. Analytical Procedure for Phthalic Anhydride in Poly (vinyl chloride) Products by Standard Addition Method

と良好に分離されることが分かった (Fig. 1).

したがって、PA→MoEP→MEP の変換 (Fig. 2 a) が定量的であれば、生成した MEP を HPLC で分析することにより、PVC 製品中の PA を正確に定量できるものと考えられる。

2. PA→MoEP の変換

本法では PVC 製品から PA を抽出するのに試料を一度 THF に溶かした後、メタノールを加えて PVC を析出させ、ろ過して除く方法を採用した。そこで、THF の存在下において PA→MoEP の変換が定量的に進むような反応条件を検索した。PA→MoEP の変換率は、生成した MoEP をメチル化して MEP とした後 HPLC で定量して求めた。

2-1 ステアリン酸 Ca, Zn 添加の効果 まず、PA 1000 μg をエタノール 10 ml に溶かし、THF を加えず

に20分間加熱・還流した場合には PA→MoEP の変換率は96%と定量的であった。これに対して、THF 10 ml を共存させて同様の操作を行った場合の変換率は14%に過ぎず、THF の存在は PA とエタノールの反応を抑制することが分かった。

こうしたことから、THF の存在下において PA→MoEP の変換を促進する効果をもつものがないか種々の化合物を加えて検討したところ、PVC の安定剤の1つであるステアリン酸 Ca, Zn が促進効果を示した。

そこで、PA 50 μg にステアリン酸 Ca, Zn 0—20 mg を加えて THF 10 ml に溶かし、更にエタノール 10 ml を加えて20分間加熱・還流した後、Amberlyst 3 g と振り混ぜた場合の PA→MoEP の変換率を検討した。その結果、MoEP への変換率はステアリン酸 Ca, Zn の添加量が増すとともに高くなるが、10 mg 以上ではほぼ一定

Fig. 1. Chromatogram of a Mixture of Phthalate Standards

Peaks: DMP; dimethyl phthalate, MEP; methyl ethyl phthalate, DEP; diethyl phthalate, DBP; dibutyl phthalate, DEHP; di(2-ethylhexyl) phthalate.

HPLC conditions: column; Nucleosil 5 C₈ (Nagel, Particle size 5 μ , 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.), mobile phase; acetonitrile-water (60:40), flow rate; 1.0 ml/min, detector; ultraviolet detector, detection wavelength; 254 nm.

となることが分かった (Fig. 3).

以上の結果から、本法においては PVC 製品 1 g に対してステアリン酸 Ca, Zn 10 mg を加えて操作することとした。

なお、ステアリン酸 Ca, Zn が PA $\rightarrow$ MoEP の変換を促進するメカニズムについては不明であり、更に検討が必要である。

2-2 THF 中の水の影響 市販の THF 中には水がかなり含まれており、試料を溶かす操作の間に PA の

一部が加水分解を起こしてフタル酸に変化する可能性がある (Fig. 2b).

そこで、市販の THF をそのまま用いた場合とこれを水素化カルシウムで脱水後蒸留した THF を用いた場合とを比較した。すなわち、PA 1000 μ g 及びステアリン酸 Ca, Zn 10 mg を市販の THF あるいは蒸留した THF 10 ml に溶かし、マグネチックスターラーで1時間かき混ぜた後、エタノール 10 ml を加えて20分間加熱・還流した。以下定量法に準じて操作し、得られたクロマトグラムを比較した。

Fig. 4 に示したように、市販の THF をそのまま用いた場合には、フタル酸由来の DMP の大きなピークが認められ、添加した PA がかなり加水分解を起こしていることが分かった。PA の MEP としての回収率も59%に過ぎなかった。

これに対して、脱水後蒸留した THF を用いた場合には、DMP のピークはかなり小さくなり、PA の回収率も90%まで上昇した。蒸留した THF を用いても DMP のピークが完全には消失しなかったのは、蒸留した THF の保存中や PVC の溶解操作中に THF が吸湿するためと考えられる。

3. MoEP $\rightarrow$ MEP の変換

遊離の MoEP は、酢酸エチル 1 ml に溶かし、氷冷下でジアゾメタン・ジエチルエーテル溶液 1 ml を加えて30分間放置することによって、定量的に MEP に変換される。

3-1 陽イオン交換樹脂による処理 ステアリン酸 Ca, Zn の添加により PA $\rightarrow$ MoEP の変換は促進されるが、生成した MoEP の一部がカルシウムや亜鉛の塩となってジアゾメタンではメチル化されなくなる。このため、ステアリン酸 Ca, Zn を加えて操作した後、陽イオ

Fig. 2. Conversion of Phthalic Anhydride to Methyl Ethyl Phthalate (a) and Dimethyl Phthalate (b)

Fig. 3. Effect of Addition of Ca, Zn Stearate on the Yield of Monoethyl Phthalate in the Presence of Tetrahydrofuran (THF)

Fifty microgram of PA and 0–20 mg of Ca, Zn stearate were dissolved in a mixture of 10 ml of THF and 10 ml of ethanol, and the solution was refluxed for 20 min. After shaking the reaction mixture with cation-exchange resin (Amberlyst), MoEP was methylated to MEP with diazomethane and determined by HPLC method. HPLC conditions used were the same as those in Fig. 1.

Fig. 4. Effect of Dehydration of Tetrahydrofuran on the Conversion of Phthalic Anhydride to Methyl Ethyl Phthalate

(a) commercial THF, (b) dehydrated THF.
Peaks: DMP; dimethyl phthalate, MEP; methyl ethyl phthalate.
One thousand microgram of PA and 10 mg of Ca, Zn stearate was used for the experiment. Other procedures were the same as those described in Fig. 3.

ン交換樹脂による処理を行わなかった場合には、PA 添加量の24%が MEP として回収されたに過ぎなかった。

そこで、反応液に非水系用の陽イオン交換樹脂である Amberlyst を加えて振り混ぜ、MoEP のカルシウムや亜鉛の塩を遊離の MoEP とした後、メチル化する方法について検討した。すなわち、MoEP のカルシウム塩 1000 μg を THF-エタノール-メタノール (5:10:5) 混液 20 ml に溶かし、Amberlyst 3 g を加えて30分間振

り混ぜた後にメチル化して分析したところ、添加した MoEP のカルシウム塩の96%が MEP となって検出された。

4. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ

軟質 PVC 製品からは多量の DEHP が抽出されてくるため、抽出液をそのまま HPLC 分析するのは分析に長時間を要するだけでなく、分離カラムを汚す原因にもなる。そこでシリカゲルカラムによる DEHP の除去を試みた。

DMP, MEP, DEP, DBP 及び DEHP (各 1000 μg) をジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液 2 ml に溶かし、シリカゲルカラム (シリカゲル 4 g をジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液を用いて湿式法によりクロマト管に充填したもの) に負荷した後、ジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液 50 ml 及び (10:90) 混液 50 ml で溶離し (それぞれ第1画分及び第2画分とする)、これらのフタル酸エステル類の溶出パターンを検討した。その結果、まず第1画分に DBP 及び DEHP が溶出し、次いで第2画分に DMP, MEP 及び DEP が溶出することが分かった。

次に、軟質 PVC 製品のように DEHP 量が PA 量に比べて圧倒的に多い場合を想定して、DEHP 200 mg と MEP 50 μg の混合物を用いて同様の検討を行った。この場合には、DEHP のほとんどは第1画分に溶出したが、第2画分にも一部検出された。一方、MEP はこ

Fig. 5. Calibration Curve for Phthalic Anhydride

PA (2–1000 μg) was added to 1.00 g of chopped sample (No. 2 in Table II), and determined by the proposed method.

TABLE I. Reproducibility of Peak Height Value as a Function of Amount of PA added

PA added (μg)	Peak height (arbitrary unit)						R.S.D. ^{b)} (%)
	No 1	2	3	4	5	mean($\pm$ S.D.) ^{a)}	
2	1.15	1.40	1.30	(2.40 ^{c)})	1.25	1.28 $\pm$ 0.10	8.16
10	9.30	8.00	8.20	8.55	8.00	8.41 $\pm$ 0.55	6.49
100	74.4	79.2	72.0	75.2	74.8	75.1 $\pm$ 2.60	6.75
1000	824	830	824	808	824	822 $\pm$ 8.25	1.00

a) S.D.: standard deviation.

b) R.S.D.: relative standard deviation.

c) This value was abandoned as an unusual value based on the result of Smirnov's gap test at $p < 0.01$ (Ref. 8).

の場合にも第2画分に定量的に溶出することが分かった。そこで、ジエチルエーテル-ヘキサン (5:95) 混液の量を増して、DEHP が溶出しきってから (10:90) 混液を流して、MEP を溶出しようと試みたが、100 ml まで増すと DEHP がまだ溶出しきらないにもかかわらず MEP の一部が第1画分に溶出するようになり良好な結果が得られなかった。

このように、本法を実際の PVC 製品の分析に適用する場合、試験溶液から DEHP を完全には除去できていないため、分析に長時間かかるという問題点が残されており、この点については今後更に検討が必要である。

5. 本法の適用範囲

Table II, No. 1 の試料 1.00 g に PA を 2, 10, 100 あるいは 1000 μg 加え、定量法に準じて操作し、得られたクロマトグラム上の MEP のピーク高さを PA の添加量に対して両対数グラフ上にプロットしたところ、Fig. 5 のように良好な直線性を示し、本法により PVC 製品中の PA を広い濃度範囲にわたって定量できることが分かった。

Table I には、各添加量において5回繰り返し実験した場合の MEP のピーク高さの測定値と相対標準偏差を示した。相対標準偏差はいずれも8%以下であった。

6. 市販試料の分析

あらかじめ試験的にいくつかの PVC 製品について分析したところ、PA はごく少量しか含まれていないことが分かったので、標準添加法による定量を試みた。

Table II の9種の試料を本法 (標準添加法) により分析し、得られたクロマトグラム上の MEP のピーク高さを PA の添加量に対してプロットしたところ、いずれの試料においても相関係数0.98以上の良好な直線性を示し、その横軸切片から試料中の PA 量を求めることができた。

クロマトグラムの1例を Fig. 6 に、また分析結果を Table II に示した。著者らが検討した範囲では、PVC 製品中の PA 含有量の最大値は 2.6 $\mu\text{g/g}$ で、道祖土ら

の報告⁴⁾にある 0.7% (7000 $\mu\text{g/g}$) というレベルよりもはるかに少なかった。

PVC 製家庭用手袋による接触皮膚炎患者3名がいずれも1% PA のパッチテストに対して陰性の反応を示したという関東らの知見⁹⁾から考えると、今回検出されたレベルの PA では事故の原因となっている可能性は少ないと思われる。

7. 道祖土らの方法⁴⁾について

① PA 5 mg, ② Table II, No. 2 1.00 g に PA 5 mg を添加したもの、③ Table II, No. 2 1.00 g の3種を試料に用いて道祖土らの方法⁴⁾の追試を行ったところ、

Fig. 6. Chromatogram for Sample No. 1 in Table II Spiked with 5 μg of Phthalic Anhydride

HPLC conditions were the same as those in Fig. 1.

TABLE II. Analytical Results of Phthalic Anhydride in Poly (vinyl chloride) Products

No.	Sample	Source	Phthalic anhydride found ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}
1	Chamber ^{b)} (hard type)	Eiken Kizai Co., Ltd.	ND ^{e)}
2	Chamber (medium type)		2.49
3	Chamber (soft type)		2.55
4	Tube ^{b)}		0.45
5	Tube		1.80
6	Pelet ^{c)}		0.12
7	Pelet		1.33
8	Domestic gloves ^{d)}	Toho University	ND
9	Domestic gloves		0.36

a) Average value ($n=3$).

b) Used for medical devices.

c) Source material of PVC products.

d) Suspected to be the causative product of contact dermatitis.

e) Not detected.

Fig. 7. Gas Chromatograms by Modified Saido's Method^{a)}

(a) PA 5 mg

(b) Sample No. 1 in Table II 1.00 g+PA 5 mg.

(c) Sample No. 1 in Table II 1.00 g

a) Temperature-gradient condition was different from original method (Ref. 4).

GC conditions: column; 5% OV-17 on Shimalite W (80–100 mesh), 1 m×3 mm i.d., column temperature; hold at 135°C for 10 min, then raised to 295°C at the rate of 20°C/min, injection port and detector temperature; 300°C, carrier gas; N₂, flow rate; 30 ml/min.

PA だけの場合 (①) の回収率は31%であり, また PVC 製品に PA を添加した場合 (②) にはわずか8%であった (Fig. 7). このように回収率が悪かったのは, 前処理の段階で PA が THF の水や添加したメタノールと反応してロスしてしまったためと考えられる.

こうしたことから, 道祖土らの方法⁴⁾ は PVC 製品中

の PA の定量分析に用いるには適当でないと考えられる.

また, 本法による定量値 (2.6 $\mu\text{g/g}$ 以下) と道祖土らの報告⁴⁾ にある値 (7000 $\mu\text{g/g}$) との間の大きな食い違いの原因については, 道祖土らの試料を分析していないのではっきりとは分からない. しかしながら, Table II の

試料を道祖土らの方法⁴⁾によって分析したところ, Fig. 7c に1例を示したように, いずれの試料からも PA を検出できなかったことは, PVC 製品中の PA の含有量はごく少ないという本法の分析結果を裏付けるものと考えられる。

謝辞 かぶれ事故を起こした家庭用手袋をご提供下さいました東邦大学・(故)石原教授, 並びに種々の PVC 製品をご提供下さいました栄研器材⁵⁾に深謝致します。

引用文献

- 1) 木藤寿正, 鳥栖研一, 労働科学, **29**, 625 (1953).
- 2) 太田武夫, 原 一郎, 宮城信雄, 産業医学, **20**, 228 (1978).
- 3) M.J. Ward, D. Davies, *Clin. Allergy*, **12**, 165 (1982).
- 4) 道祖土勝彦, 渡部武則, 本橋重康, 黒木 健, 池村 糺, 里見政吉, 桐澤 誠, 衛生化学, **27**, 16 (1981).
- 5) 厚生省生活衛生局家庭用品安全対策室, “家庭用品に係る健康被害病院モニター報告 (5年間のまとめ),” 1984.
- 6) R. Prakash, *Paintindia*, **33**, 8 (1983).
- 7) E.A. Kruglov, L.G. Tsypysheva, G.D. Kharlampovich, T.V. Portnova, *Zh. Anal. Khim.*, **35**, 122 (1980).
- 8) 大崎 純, “公衆衛生における実践統計学,” 講談社, 東京, 1979, p.37.
- 9) 石原 勝, 関東裕美, 未発表データ.