椅子張り地に用いられる人工皮革中の抗菌剤 10,10'-Oxybis-10H-phenoxarsine の分析

五十嵐良明,* 鹿庭正昭, 中村晃忠

国立医薬品食品衛生研究所

Determination of Antimicrobial, 10,10'-Oxybis-10H-phenoxarsine, in Artificial Leather Used for the Seat of Chairs

Yoshiaki IKARASHI,* Masa-aki KANIWA, and Akitada NAKAMURA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received April 17, 2000; Accepted May 31, 2000)

Recently, a case of patients with allergic contact dermatitis caused by the poly (vinyl chloride) (PVC) seat, containing 10,10'-oxybis-10H-phenoxarsine (OBPA), of a chair was reported. OBPA was developed as an antimicrobial for plastics such as PVC and polyurethane, and it has been widely used in artificial leather for the seats of chairs and sofas. To identify causative chemicals for allergic contact dermatitis, a combination of patch testing in the patients and chemical analysis of causative products is valuable. However, no analytical method and data of OBPA in commercial products was reported. In this study, a method for the determination of OBPA in the artificial leather (PVC base) was developed. OBPA was extracted from PVC samples with methanol. The extract was loaded on an aluminum oxide column, and washed with diethyl ether:hexane, and eluted with ethanol:hexane. The eluate was evaporated, dissolved in methanol and injected to a HPLC equipped an ODS column and an UV detector (detection wavelength 300 nm). OBPA standard crystal was isolated from commercial agents containing OBPA. The calibration curve for OBPA was linear in the range of 0.1—100 µg/ml. The minimum detection and determination concentrations of OBPA in samples were 0.07 and 0.25 µg/g. By this method, eight PVC sheets for the seat of a chair were analyzed. In two PVC sheets, 52.7 and 84.9 µg/g of OBPA were detected. In the PVC product that caused contact dermatitis, OBPA was not found.

Key words—10,10'-oxybis-10H-phenoxarsine; OBPA; antimicrobial; determination; poly(vinyl chloride); HPLC

緒 言

10,10'-Oxybis-10H-phenoxarsine (OBPA) は有機ヒ素系のプラスチック用抗菌防カビ剤で、塩化ビニル樹脂、ウレタン樹脂、ポリエチレン樹脂、ゴムエラストマーなどに練り込まれて使用される。^{1,2)} 新築住宅では、家屋の欧米化などからリビングダイニングルームが中心になり、どこ家庭でもそこにソファやダイニングテーブルなどが置かれるようになっている。椅子の張り地材としては、従来は天然皮革や布などが使用されていたが、近年は、汚れ防止や洗浄のしやすさ、色の種類の豊富さなどからビニルレザー、プロテインレザーあるいはモールドウレタンと呼ばれるポリ塩化ビニル [poly(vinyl chloride), PVC] をベースとした人工皮革が使用されており、清潔志向から、更に抗菌剤を配合されたものが多いになっている。OBPA はこうしたプラスチックに使用されることが多いとされ、一般家庭で直接皮膚と接触する機会が多いと思われる。OBPA には皮膚刺激性が認められており、^{3,4)} 更に OBPA 含有 PVC シートによる皮膚炎の症例も報告されている。⁵⁾ し

たがって、皮膚障害の原因物質としての OBPA の特定や使用実態についての調査が必要と考えられるが、その分析方法や含有量についてのデータは見当たらない。そこで、OBPA の高速液体クロマトグラフィーによる分析法について検討し、この方法を椅子張り地材の分析に適用した。

材 料 と 方 法

試料

椅子用の張り地材 8 種 (材質商品名: ビニルレザー及びプロテインレザー), 厚さ約 1 mm. いずれもベースポリマーは PVC で、表面を PVC-アクリル系表面処理剤によりコーティング、裏面にはガーゼ状のもの (素材不明) が接着したもの。これらのうちビニルレザー 1 種は、皮膚障害を起こした原因とされる椅子から 1997 年に回収したもので、OBPA を抗菌剤として使用して製造したとのメーカーからの情報を得た。⁵⁾ その他 5 種のビニルレザーは、椅子に使われたものと同素材の色違いのもので、OBPA を同処方では添加して同時期に製造された。これらのビニルレザーは 1997 年にメーカー

から供与された。プロテインレザーは、メーカー記載によると、PVCにコラーゲンを配合したとされる複合材で、OBPA含有の有無は不明、1999年に入手した。

試薬

Vinyzene BP5-2PGは(株)野村事務所から供与された。Vinyzene BP5-2PGは、OBPAの2% propylene glycol (PG) 溶液である。OBPAの化学構造式をFig. 1に示した。ヘキサン、メタノール、ジエチルエーテルは和光純薬工業製特級を、酸化アルミナは、Merck社製 Aluminiumoxide 90 (粒径0.063—0.200 mm) を用いた。

OBPA標準品はVinyzene BP5-2PGから単離した。Vinyzene BP5-2PG 1容量に対して、ヘキサンを2倍量加えて振り混ぜた後、冷凍庫(−20℃)で30分間放置した。分離した上層を分取し、100 ml ナス型フラスコに集めた。下層には再度ヘキサンを加えて、同様の抽出を4回行った。集めた上層については、50℃の水浴でエバポレーターを用いてヘキサンを留去し、一晚室温で放置後、析出した結晶をヘキサンで洗いながら減圧ろ過して分取した。下層も室温で一晩放置後、析出した結晶をヘキサンで洗いながら減圧ろ過して分取した。

器具及び装置

酸化アルミナカラム：酸化アルミナ5 gを内径10 mm、長さ300 mmの活せん付きガラスカラム管にヘキサンで湿式充てんした。

ガラス製遠心管：50 ml 容量

ろ紙：アドバンテック東洋製 No. 2

紫外可視分光光度計：島津製作所製 UV-160A

HPLC：島津製作所製 LC6A型ポンプに相馬光学製 UV-VIS 検出器 S-3702を接続して用いた。また別に、島津製作所製 SPD-M6A フォトダイオードアレイ UV-VIS 検出器を接続し定性確認を行った。島津製作所製 CLASS-LC10 システムを用いて、システム制御及びデータ処理を行った。

試験溶液の調製

抽出：試料を1 mm×10 mm 程度の大きさに細切

Fig. 1. Chemical Structure of 10,10'-Oxybis-10H-phenoxarsine (OBPA)

し、0.50 g をガラス製遠心管に入れ、メタノールを10 ml 加えた後、振とう機を用いて、室温下で30分間振とうした。上清はろ紙を通して100 ml のナス型フラスコに移した。さらに、試料には同量のメタノールを加え、同様の抽出操作を更に3回行った。メタノール層を合わせ、50℃水浴上でロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除き、抽出物を得た。

クリーンアップ：抽出物が入ったフラスコに少量のメタノールと酸化アルミナを入れ、エバポレーターを用いてメタノールを除去しながら抽出物を酸化アルミナに吸着させ、これを酸化アルミナカラムに積層した。ジエチルエーテル-ヘキサン (5 : 95) 50 ml で洗浄後、エタノール-ヘキサン (20 : 80) 50 ml で溶出した。得られた画分は溶媒を減圧留去し、メタノール1 ml を加えて溶解したものを試験溶液とした。

試験操作

HPLC 条件

カラム：TSK-GEL ODS-80TS QA (4.6 mm i.d.×150 mm) (東ソー)

カラム温度：30℃

移動相：メタノール-水 (75 : 25)

流速：1.0 ml/min

検出波長：300 nm

定量

試験溶液10 µl を HPLC に注入し、クロマトグラム上で OBPA に相当するピークの面積を測定し、あらかじめ種々の濃度の OBPA-メタノール溶液を用いて作成した検量線から試験溶液中の OBPA の濃度 $A(\mu\text{g/ml})$ を求め、次式により試料中の含有量を算出した。

OBPA の含有量 ($\mu\text{g/g}$) = $A \times 1 / \text{試料採取量 (g)}$

結果と考察

OBPA の分離

Vinyzene BP5-2PG は OBPA の2% PG 溶液であり、これを標準品として OBPA の定性が可能である。一方、Vinyzene BP5-2PG 中の OBPA 含量はメーカー公表のおおよその値であるため、OBPA の正確な定量は困難である。定量には溶媒 (PG) のない OBPA だけの標準品が求められるが、これは入手不可能であった。そこで、Vinyzene BP5-2PG から OBPA を分離して、これを標準品とすることにした。

OBPA は Vinyzene BP5-2PG 中で PG に溶解しているので、溶媒としての PG 量を減らせば OBPA が析出してくるのではないかと考えた。さらに、OBPA はアルコールやクロロホルムなどに溶解するので、²⁾ 極性の低い有機溶媒への溶解度は大きくないと思われた。Vinyzene BP5-2PG にヘキサンを加えた結果、抽出による PG の相対含量の低

下, OBPA のヘキサンへの不溶性が関係して, OBPA を結晶として単離することができた. 単離した OBPA の融点は実測値 182—183°C で文献値²⁾ とほぼ一致し, 元素分析の結果は C 57.37%, H 3.43 % で理論値²⁾ との差は 0.3 % 以内であることより, ほぼ純品と考えられた.

OBPA をクロロホルム又はメタノール溶液として, UV スペクトルを測定した. 200—400 nm の範囲では, メタノール溶液とした場合, Vinyzene BP5-2PG 及び OBPA とともに, 218 nm 及び 300 nm 付近にピーク吸収をもつことが分かった (Fig. 2). クロロホルム溶液とした場合は, 250 nm 及び 320 nm 付近にピーク吸収を示した.

HPLC カラムの選択

OBPA のクロロホルム溶液をシリカ系カラムに注入し, ヘキサン-クロロホルム溶液を移動相とした場合, クロロホルムと同時に溶出しはじめ, 更にピークはテーリングした. カラムを ODS に変更し, メタノール溶液を移動相として分析したところ, 保持時間 8 分前後に形状のよいピークとなって検出された. したがって, HPLC カラムとしては ODS を選択した. また, メタノール溶液を移動相として用いるため, OBPA の検出波長は先の UV スペクトル (Fig. 2) を参考に, ピーク検出の特異性と感度を考慮して, 300 nm とした.

検量線

種々の濃度の OBPA-メタノール溶液を作成し, 検量線を作成した. OBPA 濃度 0.1—100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で相関係数が 0.9999 の良好な直線性が得られた (Fig. 3). 検出限界と定量限界は, ベースラインノイズとシグナルの確率論的性質から測定精度と検出限界などを推定する Function of Mutual Information (FUMI) 理論⁶⁾に基づき, その計算ソフト Total Optimization of Chemical Operations (TOCO)⁶⁾ から求めた. 本分析系における OBPA の検出限界は 0.07 $\mu\text{g/ml}$, 定量限界は 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であった.

抽出法の検討

Fig. 2. Ultraviolet Absorption Spectrum of OBPA in Methanol
OBPA 32 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 3. Calibration Curve of OBPA

OBPA 含有 PVC 製品 (Table 1, No. 5) を試料として, 各有機溶媒による OBPA の抽出効率を比較した. 抽出溶媒として, ゴム製品など高分子材料からはアセトン-クロロホルム (1 : 1) の抽出効率が良いとされる.⁷⁾ また, 食品容器などのプラスチック容器の抽出溶媒としては 20% エタノール溶液が使用されている.⁸⁾ 今回は, アセトン-クロロホルム (1 : 1) 及びメタノールの 2 種について検討した.

試料 0.5 g に対し溶媒 10 ml を加えて 30 分間振とうして抽出した. アセトン-クロロホルム (1 : 1) での抽出物についてはクロロホルムに溶解して, HPLC に注入した. アセトン-クロロホルム (1 : 1) では PVC 製品に含まれていた OBPA が 1 回でほとんど抽出され (88%), 2 回目以降の抽出物中の検出量はわずかであった. メタノール抽出した場合, 1 回目で全 OBPA 量の 56%, 2 回目が 21%, 3 回目では 16% が抽出され, 5 回目の抽出分には検出しなかった (Fig. 4). 得られた OBPA 量はメタノールとアセトン-クロロホルム (1 : 1) 間で変化はなく, 抽出効率に差はあるものの, どちらの溶媒でも良好に抽出されることが分かった. アセトン-クロロホルム (1 : 1) による抽出操作による OBPA 以外の抽出物量は, メタノール抽出での量に比べて多く, 更にメタノールに対して不溶物が認められた. よって, 本試験ではメタノールを抽出溶媒として, 30 分間の振とう抽出を 4 回することにした.

クリーンアップ法の検討

有機溶媒によって抽出される PVC 製品中の可塑剤など様々な添加剤による分析の際の妨害を除去するため, 酸化アルミナを用いたカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを試みた. 抽出物の場合と同様に, OBPA-メタノール溶液 (12.5 $\mu\text{g/ml}$) を酸化アルミナに吸着させた後, 酸化アルミナカラムに負荷した. OBPA はジエチルエーテル-ヘキサン

Fig. 4. Extraction Efficiency of OBPA from PVC Sheet with Acetone : Chloroform (1 : 1) or Methanol

Sample No. 5(0.5 g) was shaken with 10 ml of each solvent for 30 min at room temperature.

(5 : 95) 50 ml では溶出せず、次に、エタノール-ヘキサン (20 : 80) 50 ml を流すと溶出した。同溶液を 30 ml, 加えてエタノール-ヘキサン (50 : 50) を流しても、さらなる OBPA の溶出はなかった。PVC 抽出物をカラムクロマトグラフィーに適用し本条件で溶離させたところ、抽出物の多くがジエチルエーテル-ヘキサン分画に溶出した。OBPA が溶出するエタノール-ヘキサン分画の HPLC クロマトグラムは 35 分以内にすべてのピークが出終わり、クリーンアップが良好に行われることが分かった。

OBPA 標準品 12.5 μg 又は OBPA 含有 PVC 製品の抽出物 (Table 1, No. 3 and No. 5) について、カラムクロマトグラフィーによる回収試験 ($n=6$) を行ったところ、 $91 \pm 3\%$ と満足いくものであった。

担体として、シリカゲル 2.5 g, フロリジル 5 g についても同溶出条件で検討した。2つの担体とも OBPA の回収率は酸化アルミナと同等であった。フロリジルからエタノール-ヘキサン (20 : 80) で溶出すると、分析については問題ないものの、担体からの溶出物のピークが現れた。シリカゲルについては良好に回収され、酸化アルミナの代替となると思われる。

OBPA 分析の再現性

PVC 製品 [Table 1, No.5 (OBPA 含量 52.7 $\mu\text{g/g}$)] について、一連の操作後、分析したときの OBPA 定量値の再現性を調べた ($n=5$)。その結果、変動係数 4% 以下と良好な再現性を得た。

市販 PVC シートの分析

PVC 製椅子用張り地材 8 検体について分析した。分析結果を Table 1 に、OBPA 標準品及び一部の製品のクロマトグラムを Fig. 5 に示した。また、フォトダイオードアレイ UV-VIS 検出器を接

Table 1. Analytical Results of OBPA in the PVC Sheet

Sample No.	Material trade name	Base material	Color	OBPA ($\mu\text{g/g}$)
1	Vinyl leather	PVC	Blue	ND
2	Vinyl leather	PVC	Dark brown	ND
3	Vinyl leather	PVC	Green	84.9
4	Vinyl leather	PVC	Light brown	ND
5	Vinyl leather	PVC	Pink	52.7
6*	Vinyl leather	PVC	Blue	ND
7	Protein leather	PVC, collagen	Black	ND
8	Protein leather	PVC, collagen	Dark red	ND

ND means below 0.25 $\mu\text{g/g}$.

* Recover from the causative chair.

続して、OBPA の保持時間付近に現れたピークはその UV スペクトルを OBPA 標準品のものと比較して、定性を行った。OBPA は保持時間 8 分前後に形状のよいピークとなって検出された [Fig. 5(a)]. いくつかの製品では、OBPA のピーク付近にごく小さいピーク (OBPA と換算して 1 $\mu\text{g/g}$ 未満) が現れるものがあった [Fig. 5 (b)]. しかし、ピークの保持時間に若干のずれがあること、UV スペクトルで 300 nm 付近に極大値を取るようなスペクトルが得られないことから、このピークは OBPA ではないと判断した。ビニルレザーシートでは、ピンク色 [Fig. 5 (c)], 黄緑色の検体でそれぞれ 52.7, 84.9 $\mu\text{g/g}$ の OBPA が検出されたが、他 4 検体では定量限界値以下であった (Table 1). Fig. 5(d) に示すように、プロテインレザーには OBPA は検出されなかった。ビニルレザーに関しては、一定量の OBPA が添加されているとされながら、定量値に大きな違いがあった。この理由として、PVC 製品の製造及び保存中における OBPA の化学変化が 1 つ考えられる。しかし、試料 No. 1—5 は同時期にメーカーから直接供与されたものであり、メーカーの情報では OBPA の安定性は良いとされている。^{1,9)} 製品の色の違いによって分析値に違いがあることから、ビニルレザー製造中に使用された他の添加剤などと OBPA との反応も考えられるが、詳細は不明である。

PVC 製品などへの Vinyzene BP5-2PG の使用量は 1.5—2.5 phr (parts per hundred parts of rubber), OBPA として 0.03—0.05% とされている。⁹⁾ OBPA の *Apsergillus niger* などのカビ, *Staphylococcus aureus* などの細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 1.0—3.0 ppm とされており、^{1,9)} 何点かの製品については抗菌性を発揮できるかどうか疑問であった。

OBPA を含有したビニルレザーシートによる接触皮膚炎の症例が報告されており、⁹⁾ OBPA の感作性が疑われている。しかし、皮膚障害を起こしたビニルレザーシートを分析したところ OBPA は検出されなかった [Table 1, Fig. 5 (b)]. Vinyzene BP5-

Fig. 5. Typical Chromatograms of PVC Sheets Containing OBPA

(a) OBPA 5 $\mu\text{g/ml}$, (b) sample No. 6, (c) sample No. 5, (d) sample No. 7.

HPLC conditions : Column ; ODS (4.6 mm $\times$ 150 mm), Eluent ; Methanol- H_2O (75 : 25), Flow ; 1.0 ml/min, Detection wavelength ; 300 nm.

2PG のモルモットを用いた試験では、OBPA の感作性を証明できなかったとの報告がある。¹⁰⁾ Fousereau らは OBPA 類似化合物 dichlorophenylarsin の接触によるアレルギーを報告している。¹¹⁾ これらのことから、OBPA 自体だけでなく類似化合物が感作性の本体とも考えられる。しかし、動物種差の問題もあり、OBPA の感作性については更に検討が必要であろう。今後、OBPA の分解の有無について、また分解物があるならそれらの同定、安全性について検討していきたい。

REFERENCES

- 1) Nomura Office, Inc., "Kokin No Subete," ed. by Sen-isha, Osaka, 1997, pp. 498-500.
- 2) Budavari S. ed., "The Merck Index 12th," Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, 1996, pp. 1194-1195.
- 3) "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)," National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH (SilverPlatter version), SilverPlatter International, NV, 1999.
- 4) Ballantyne B., *Toxicology*, **10**, 341-361 (1978).
- 5) Kaniwa M., Abstract of paper, 4th Congress of the European Society of Contact Dermatitis, Helsinki, Finland, July 1998, p. 105.
- 6) Hayashi Y., Matsuda R., "Precision of HPLC Analysis," Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd. Osaka, 1999.
- 7) Kaniwa M., Kojima S., Nakamura A., Kantoh H., Itoh M., Ishihara M., *Eisei Kagaku*, **30**, 126-137 (1984).
- 8) "Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists-With Commentary-1990," ed. by the Pharmaceutical Society of Japan, 1995, p. 766.
- 9) Abe Y., Sudo M. ed., "New edition. Plastic Additives (Basis and Application)," Taiseisha, Tokyo, 1984, pp. 430-435.
- 10) Shimizu M., Yamano T., Noda T., Abstract of paper, 35th Annual Meeting of Zenkoku Eisei Kagaku Gijutsu Kyogikai, Kochi, 1998, pp. 212-213.
- 11) Fousereau J., Benezra C., Maibach H. I. ed., "Occupational Contact Dermatitis, Clinical and Chemical Aspects," WB Saunders Co., Philadelphia, PA, 1982, pp. 171-176.