

Fig.1-a Measurement of Fe_3O_4 NPs size in medium with FBS by dynamic light scattering.

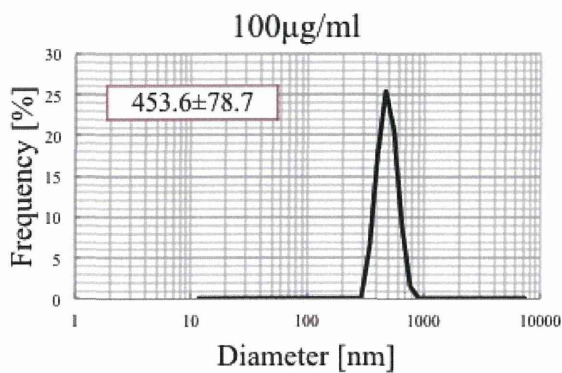
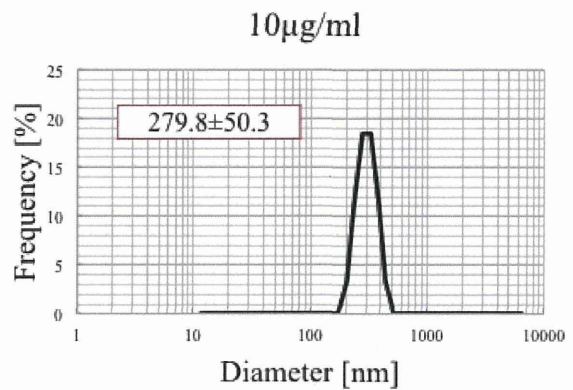
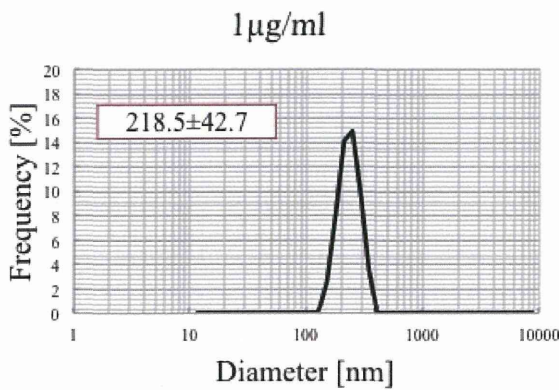


Fig.1-b Measurement of Fe_3O_4 NPs size in medium by dynamic light scattering.

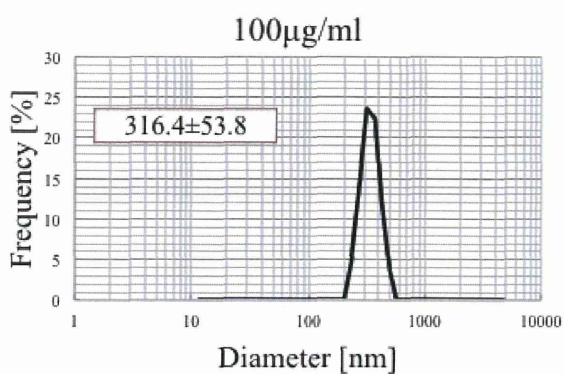
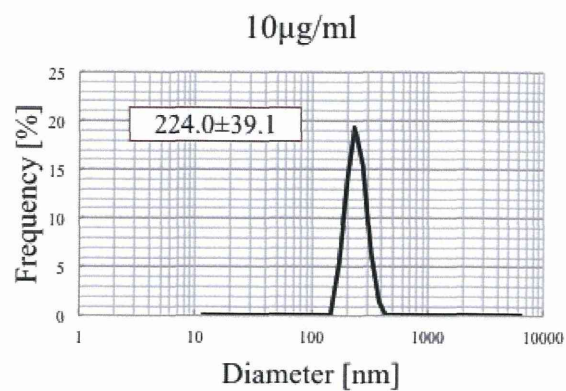
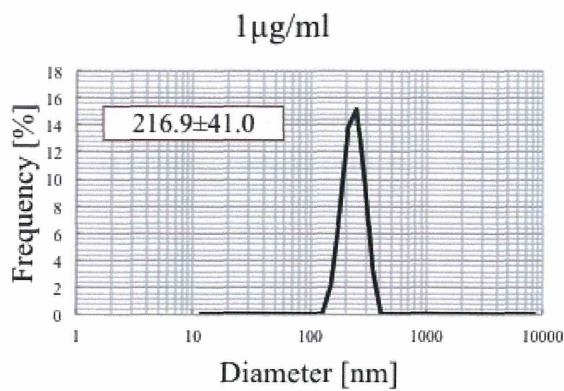


Fig.1-c Measurement of Fe_3O_4 NPs size in PBS by dynamic light scattering.

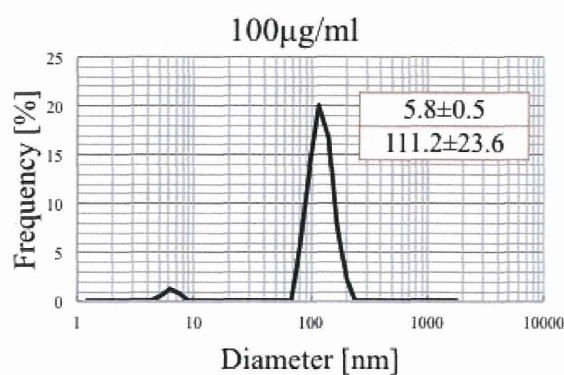
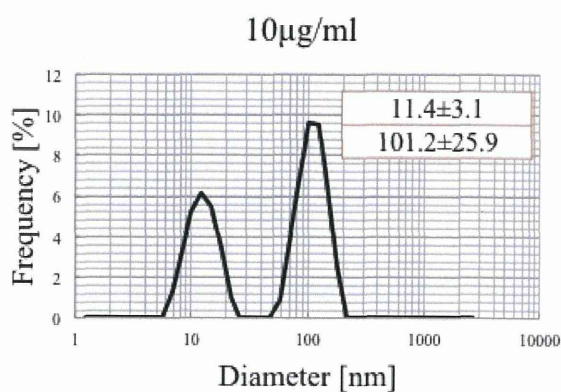
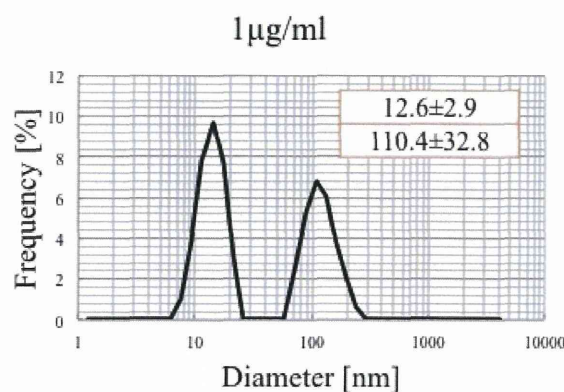


Fig.2-a Measurement of carboxylated Fe_3O_4 NPs size in medium with FBS by dynamic light scattering.

1 $\mu\text{g/ml}$

unmesurable

10 $\mu\text{g/ml}$

unmesurable

100 $\mu\text{g/ml}$

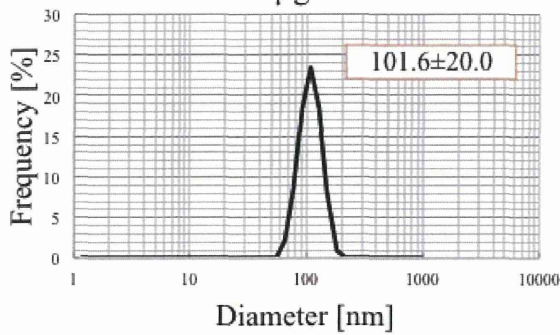


Fig.2-b Measurement of carboxylated Fe_3O_4 NPs size in medium by dynamic light scattering.

1 $\mu\text{g/ml}$

unmesurable

10 $\mu\text{g/ml}$

unmesurable

100 $\mu\text{g/ml}$

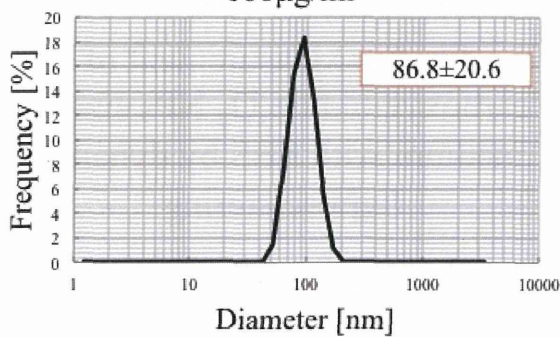


Fig.2-c Measurement of carboxylated Fe_3O_4 NPs size in PBS by dynamic light scattering.

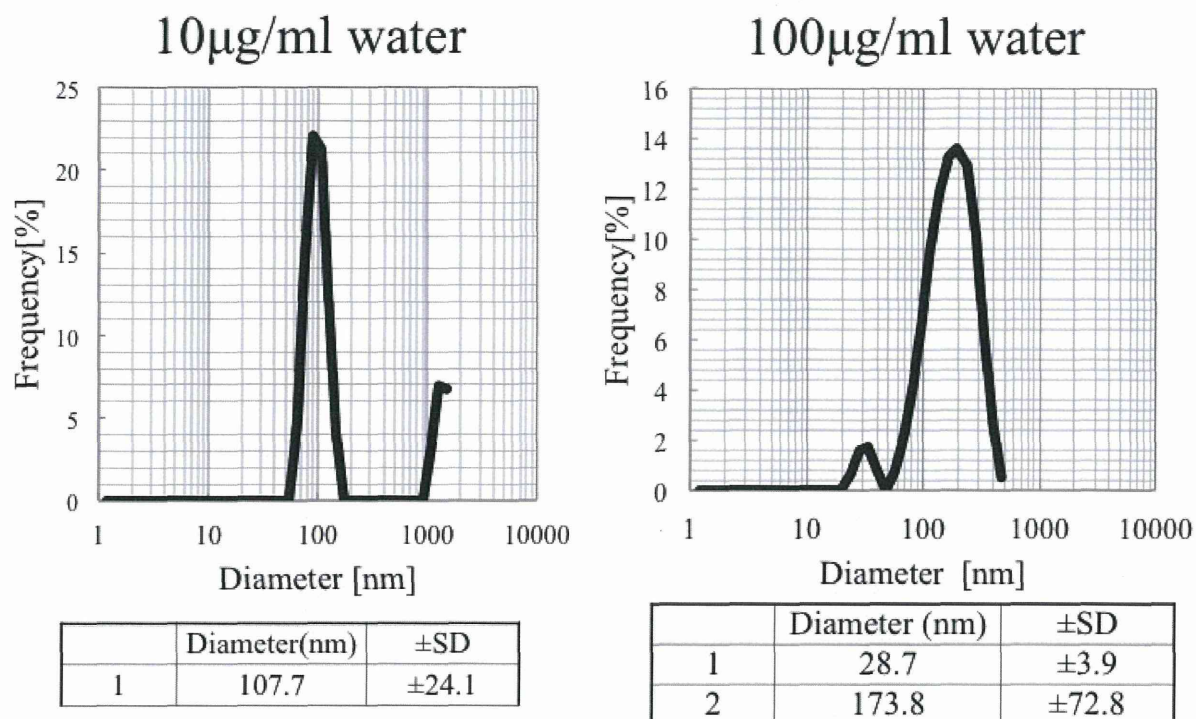


Fig.3-a Measurement of PEI coated Fe₃O₄ NPs size in water by dynamic light scattering.

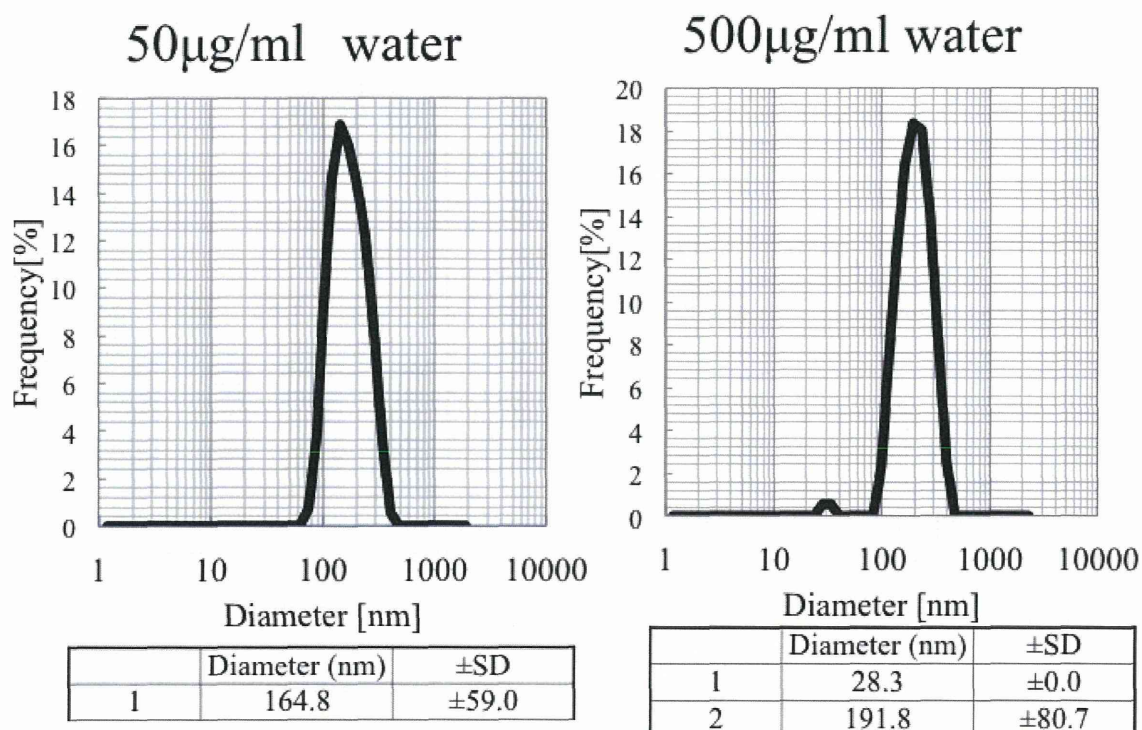


Fig.3-b Measurement of pluronic coated Fe₃O₄ NPs size in water by dynamic light scattering.

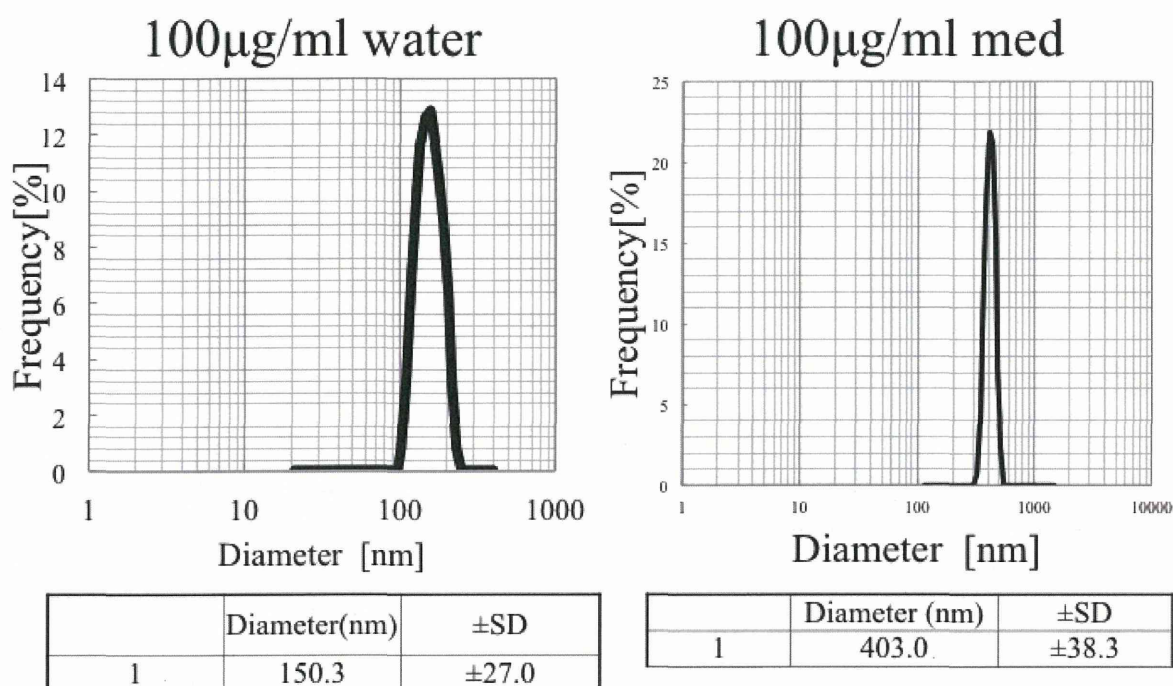


Fig.3-c Measurement of pluronic coated Fe₃O₄ NPs size in water by dynamic light scattering.

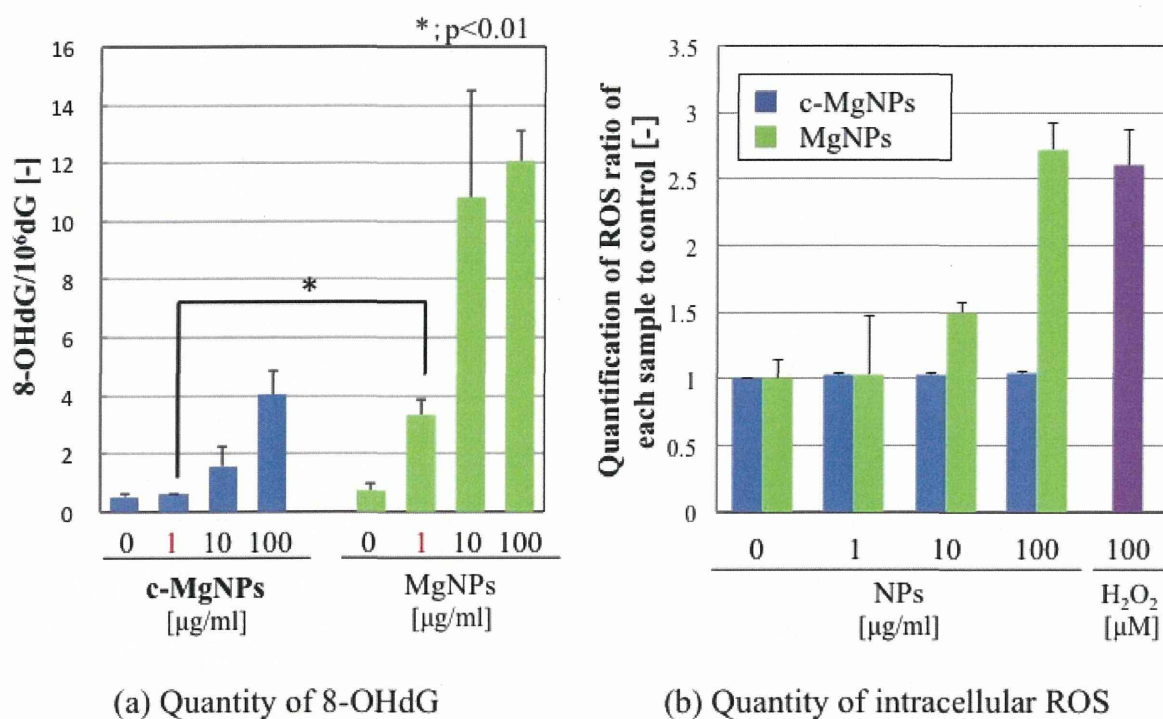
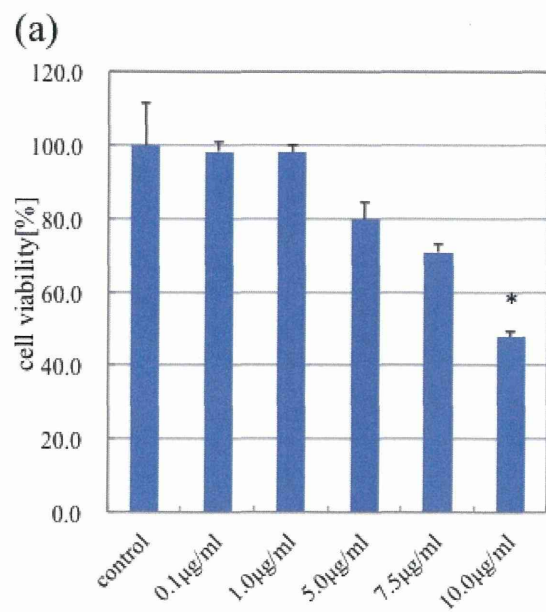
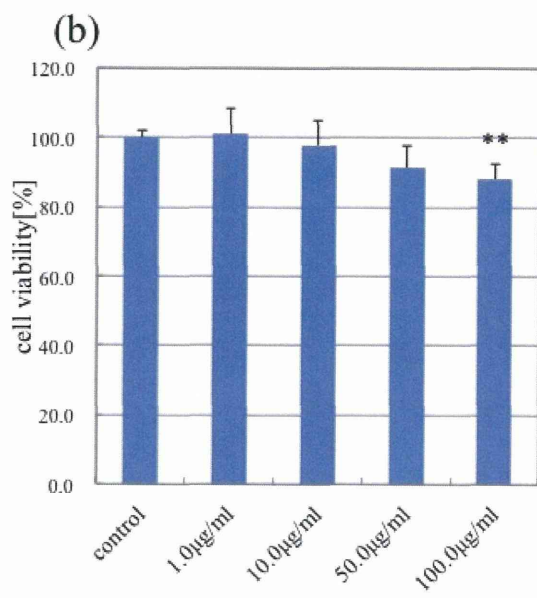


Fig.4 Levels of 8-OHdG and production of intracellular ROS in DU145 cells after treatment with Fe₃O₄ NPs/carboxylated Fe₃O₄NPs.



*; p<0.01



**; p<0.05

Fig.5 Effects of PEI/Pluronic coated Fe₃O₄ NPs on cell viability.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
花方信孝	DNA マイクロアレイ	秋吉一成、石原一彦、山岡哲二 監修	先端バイオマテリアルハンドブック	NTS	東京	2012	159-164

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
河上強志、伊佐間和郎、中島晴信、吉田仁、大嶋智子、大野浩之、上村仁、塩田寛子、菊地洋子、松岡厚子、西村哲治	有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫（TPT）及びトリブチル錫（TBT）の試験法改定に係わる検討	薬学雑誌	132	1197-1208	2012
Kawakami T, Isama K, Nishimura T	Survey of primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products in direct contact with skin and in commercial leather products in Japan	J. Environ. Chem.	22	197-204	2012
Kawakami T, Isama K, Nishimura T	Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan	J. Environ. Chem.	22	205-211	2012
大嶋智子、河上強志、山野哲夫、尾崎麻子、清水充、伊佐間和郎	有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫（TPT）およびトリブチル錫（TBT）分析法改定過程において観察された TPT の分解について	大阪市立環科研報告	74	17-22	2012
河上強志、伊佐間和郎、松岡厚子、西村哲治	防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎	J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.	6	339-350	2012

河上強志	フラーレンが植物による土壌中の疎水性化合物の吸収を促進させる？	ファルマシア	49	252	2013
Fujimoto N, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Ozawa S, Gamou T, Nemoto K, Degawa M	Estrogen and androgen receptor status in hepatocellular hypertrophy induced by phenobarbital, clofibrate, and piperonyl butoxide in F344 rats	J Toxicol Sci	37(2)	281-286	2012
Ozawa S, Gamou T, Habano W, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Nemoto K, Degawa M	Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats	J Toxicol Sci	36(5)	613-623	2012
Nemoto K, Tanaka T, Ikeda A, Ito S, Mizukami M, Hikida T, Gamou T, Habano W, Ozawa S, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Degawa M	Super-induced gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit in chemical-induced hypertrophic liver in rats	J Toxicol Sci	36(5)	507-514	2012
Xu M, Li J, Fujita D, Su H, Chen H, Hanagata N	Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interaction	Scientific Reports (e-Journal)	2	406	2012
Xu L, Li X, Takemura T, Hanagata N, Wu G, Chou LL	Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel	Journal of Nanobiotechnology (e-Journal)	10	16	2012
Zhuang F, Hanagata N	Synergic toxicity of solid particles and released zinc from zinc oxide nanoparticles to human lung epithelial cells	Nano Biomedicine	4	85-97	2012

Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A	The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells	Journal of Biomedical Materials Research: Part A	In press		
Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A	A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration	Journal of Biomedical Materials Research: Part A	In press		
伊佐間和郎、河上強志、 西村哲治	乳幼児が誤飲する可能性のあ る金属製アクセサリーからの 有害 8 元素の溶出	薬学雑誌	132	959- 968	2012
Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K	Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay system	Nanotoxicol ogy	In press		
Nakano T, Matsushima- Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y	ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from Streptomyces coelicolor	Toxicon	In press		
Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H	Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer	Cancer Lett	In press		
Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H	Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China	J Epidemiol	In press		

Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y	Induction of glandular stomach cancers in helicobacter pylori-infected mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile	Int J Cancer	130	259-266	2012
Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H	Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats	Cancer Science	103	2045-2050	2012
Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D	Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe ₃ O ₄) nanoparticles in Fischer 344 rats	Journal of Toxicologic Pathology	25	233-239	2012
Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M	Magnetic nanoparticles of Fe ₃ O ₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death.	Int J Nanomed.	In press		
渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔	前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果	日本磁気学会第187回研究会資料		7-11	2012
栗岡大輔、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、渡邊昌俊	前立腺がん化学療法への磁性体ナノ粒子の応用	化学工業	64(3)	67-73	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

—Note—

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫化合物（TPT）及びトリブチル錫化合物（TBT）の試験法改定に係わる検討

河上強志,^{*,a} 伊佐間和郎,^a 中島晴信,^b 吉田 仁,^b 大嶋智子,^c 大野浩之,^d
上村 仁,^e 塩田寛子,^f 菊地洋子,^f 松岡厚子,^a 西村哲治^{a,†}

**Examination of Analytical Method for Triphenyltin (TPT) and Tributyltin (TBT)
to Revise the Official Methods Based on “Act on the Control
of Household Products Containing Harmful Substances”**

Tsuyoshi Kawakami,^{*,a} Kazuo Isama,^a Harunobu Nakashima,^b Jin Yoshida,^b
Tomoko Ooshima,^c Hiroyuki Ohno,^d Hitoshi Uemura,^e Hiroko Shioda,^f
Yoko Kikuchi,^f Atsuko Matsuoka,^a and Tetsuji Nishimura^{a,†}

^aNational Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ^bOsaka Prefectural Institute of Public Health; 3-69 Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan; ^cOsaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences; 8-34 Tojocho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan; ^dNagoya City Public Health Research Institute; 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan; ^eKanagawa Prefectural Institute of Public Health; 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan; and ^fTokyo Metropolitan Institute of Public Health; 24-1 Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan.

(Received May 16, 2012; Accepted July 8, 2012)

The use of triphenyltin (TPT) and tributyltin (TBT) in some household products is banned by “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances” in Japan. To revise the official analytical method, the method for detecting these organotin compounds was examined in six laboratories using a textile product, water-based adhesive, oil-based paint, which contained known amounts of TPT and TBT (0.1, 1.0, 10 µg/g). TPT and TBT were measured by GC-MS after ethyl-derivation with sodium tetraethylborate. The TBT recoveries in the samples were 70–120%. The TPT recoveries in the water-based adhesive samples were 80–110%, while its concentrations in the textile product and oil-based paint samples decreased because of dephenylation during storage. However, the precision of the method examined was satisfactory because most coefficients of variation for TPT and TBT in the samples were less than 10%. Furthermore, the revised method was able to detect concentrations lower than the officially regulated value. However, the sample matrix and the condition of analytical instrument might affect the estimated TPT and TBT concentrations. Therefore, the revised method may not be suitable for quantitative tests; rather, it can be employed to judge the acceptable levels of these organotin compounds by comparing the values of control sample containing regulated amounts of TPT and TBT with those for an unknown sample, with deuterated TPT and TBT as surrogate substances. It is desirable that TPT in textile and oil-based paint samples are analyzed immediately after the samples obtained because of the decomposition of TPT.

Key words—tributyltin; triphenyltin; household product; GC-MS; surrogate substance

緒 言

トリフェニル錫化合物（TPT）及びトリブチル

The authors declare no conflict of interest.

^a国立医薬品食品衛生研究所, ^b大阪府立公衆衛生研究所, ^c大阪市立環境科学研究所, ^d名古屋市衛生研究所, ^e神奈川県衛生研究所, ^f東京都健康安全研究センター
現所属: [†]帝京平成大学

*e-mail: tkawa@nihs.go.jp

錫化合物（TBT）は防菌剤・防カビ剤として繊維製品、接着剤及び塗料などに用いられてきた。一方で、これらの化合物は皮膚刺激性を有し、経皮吸収され易く、生殖機能障害を引き起こすことが知られており、人体に直接接触する家庭用品にはこれら化合物を使用させないことを目的として、TPTは昭和54年1月1日、TBTは昭和55年4月1日に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律

(有害物質含有家庭用品規制法)」によって、対象家庭用品の基準値が設定された。¹⁾

この法律で規定されている TPT 及び TBT の試験法は、家庭用品からこれらの化合物を溶媒抽出後に、活性アルミナカラムによる精製及び硝酸分解を行い、フレイムレス原子吸光法 (AAS) によって錫量を測定する方法である。さらに、 $1\mu\text{g/g}$ 以上の錫が検出された場合には、2次元薄層クロマトグラフ法 (TLC) により TPT 及び TBT の存在を確認することが求められている。¹⁻³⁾ しかしながら、この方法ではフレイムレス AAS において錫としてしか定量できないこと、2次元 TLC での定性確認時に行われるジチゾンの噴霧により生成したジチゾン錯体の黄色の発色が短時間に消失すること、夾雑物質によりスポット位置が移動したり拡散したりすることなど、多くの分析上の問題点が指摘され続けてきた。⁴⁻⁷⁾

一方、家庭用品以外でも、例えば、ポリ塩化ビニル (PVC) 及びシリコン樹脂などには安定剤として有機錫化合物が使用されてきた。PVC 製の食品用器具及び容器包装については、現在、食品衛生法によってジブチル錫化合物 (DBT) 含有量が規制されているため、ジオクチル錫化合物 (DOT) が主流となっており、DBT や DOT について様々な分析法が検討されている。⁸⁻¹²⁾ また、船舶や漁網の塗料や防汚剤として TPT 及び TBT が利用されてきたが、低濃度の有機錫化合物による巻貝などへの悪影響が明らかとなったことから、水、底質及び生物試料中の有機錫化合物の分析法が検討されてきた。¹³⁻¹⁵⁾ これらの分析法は主に、有機錫化合物の分離にガスクロマトグラフ (GC) を用い、検出器には電子捕獲型検出器 (ECD),^{4,6,16-18)} 原子発光検出器 (AED),⁹⁾ 炎光光度検出器 (FPD)^{5,8,19)} 及び質量分析計 (MS)^{7,11-15,20-23)} を用いている。また、TPT 及び TBT などの有機錫化合物の GC 分析には誘導体化が必要となるが、その誘導体化法については Grignard 試薬を用いるプロピル化,^{5,9,13,19,20)} テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt_4) によるエチル化^{7,9-12,15,16,21-23)} 及び水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) による水素化^{5,7,8,18)} などが検討されてきた。さらに、試料溶液の精製には活性アルミナ,^{1,2,4,5,24)} シリカゲル,^{7,18,19)} フロリジル^{6,7,15,16,23)} 及び陽イオン交換樹脂^{13,17)} などが検討されている。

このように、家庭用品以外の TPT 及び TBT を始めとした有機錫化合物の試験法は様々な点で改良されているのに対して、有害物質含有家庭用品規制法ではこれまでに問題点が指摘されてはいるものの、現在でも前述のようにフレイムレス AAS 及び 2次元 TLC を用いる公定法がいまだに採用されている。有害物質含有家庭用品規制法で対象とされている家庭用品は、おしめ、おしめカバー、下着などの繊維製品、家庭用接着剤及び塗料、家庭用ワックス、くつ墨及びくつクリームであり、繊維製品、水性製品及び油性製品の3つに大きく分類して分析法が規定されている。¹⁾ そこで、われわれは家庭用品中の TPT 及び TBT について、誘導体化試薬に NaBEt_4 を、分離及び定量に GC-MS を用いて、繊維製品、水性接着剤及び塗料、油性接着剤及び塗料の分析方法を開発し報告してきた。^{7,22,23)} 今回、有害物質含有家庭用品規制法における TPT 及び TBT の試験法改定にむけて、それらの今までに開発した分析法の一部を改良し、複数の機関で繊維製品、水性接着剤及び油性塗料について既知濃度の同一試料を用いて、改正試験法としての妥当性を検討したので報告する。

方 法

1. 実施機関 国立医薬品食品衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、名古屋市衛生研究所、東京都健康安全研究センター、大阪市立環境科学研究所の6機関 (機関 A-F) で行った。なお、機関 B の結果については既に報告済みである。²⁵⁾

2. 試薬など 塩化トリブチル錫、塩化トリブチル錫- d_{27} (サロゲート物質)、塩化トリフェニル錫及びテトラブチル錫- d_{36} (TeBT-d_{36} : サロゲート物質回収率評価用) については和光純薬工業製、塩化トリフェニル錫- d_{15} (サロゲート物質) については関東化学製を用いた。これらは全機関で同一ロット製品を使用した。また、配付試料の作製には東京化成工業製の塩化トリフェニル錫及び塩化トリブチル錫を用いた。有機錫化合物以外の試薬類については、それぞれ規格に沿ったものを各機関で用意し使用した。その際、それらの製造元は特に指定しなかった。具体的には、溶媒 (ヘキサン、アセトン、エタノール、ジエチルエーテル) は JIS 規格の残留農

薬分析用を、塩酸、酢酸、酢酸ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは JIS 規格の特級試薬を、テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt₄) は一般試薬をそれぞれ用いた。2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液は、2 mol/L 酢酸及び 2 mol/L 酢酸ナトリウム水溶液を体積比 5.9:14.1 で混合後、pH=5 に調製した。また、5% NaBEt₄ 溶液は NaBEt₄ を 5% 含むように精製水に溶解し、この溶液は用時調製として使い切りにした。試料溶液の精製には、カートリッジタイプのシリカゲルカラム (Waters Sep-Pak® Plus Silica 690 mg/1.6 mL) 及びフロリジルカラム (Waters Sep-Pak® Plus Florisil® 910 mg/1.4 mL) を用いた。

3. 試料 配付試料は国立医薬品食品衛生研究所で作製し、まず国立医薬品食品衛生研究所で TPT 及び TBT を測定した後に、各機関に配付された。それらは配付後 3-5 ヶ月以内に試験が実施された。それまで配付試料は、暗所・室温で保管し、特に水性接着剤及び油性塗料の試料は乾燥しないように注意した。

添加用の TPT 及び TBT 標準溶液を、繊維及び水性接着剤試料ではアセトンで、油性塗料試料ではヘキサンでそれぞれ 1000 µg/mL となるように調製し、それぞれの試料に次に示す方法により設定濃度が塩化物として 0.1, 1.0 及び 10 µg/g となるように添加した。

繊維試料は綿布を約 1 g の大きさに裁断した後、設定濃度になるようにアセトン標準溶液を添加した。その後、アセトンを揮発させてから試料を 1 枚ずつアルミホイルで包んだ後に配付した。水性接着剤試料は木工用接着剤 (酢酸ビニル樹脂: 40%, 水: 60%) に攪拌時の均一性を向上させるために水を 10% (w/w) 加えたものを用いた。この水性接着剤試料に、設定濃度となるようにアセトン標準溶液を添加し、攪拌機 (HEIDON-BL3000) を用いて均一になるまで十分に攪拌した。この試料を 50 mL 容ネジロガラスバイアルに入れ配付した。油性塗料試料は木部用油性ニス (ウレタン樹脂, 有機溶媒) を市販の薄め液 (有機溶剤) で適度に薄めたものに、設定濃度となるように有機錫化合物のヘキサン標準液を添加し、水性接着剤と同様に均一になるまで十分に攪拌した。この試料を 50 mL 容ネジロガラスバイアルに入れ配付した。

4. 標準溶液の調製 TPT 及び TBT は、それぞれ 10 mg を正確に秤り取り、ヘキサンで正確に 10 mL に定容して標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。それぞれを 0.5 mL ずつ正確に 10 mL 容メスフラスコに移して混合し、ヘキサンで定容した (50 µg/mL)。その溶液をヘキサンで希釈し、TBT 及び TPT が各 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 2, 5, 10 µg/mL となるように検量線用標準溶液を調製した。なお、TPT 及び TBT の濃度はすべて塩化物換算で表記した。

各サロゲート物質は、それぞれ 1 mg を正確に秤り取りヘキサンで 10 mL に定容して標準原液 (100 µg/mL) を調製した。ただし、1 mg を正確に秤量することが困難な場合には 10 mg を秤り取り、適宜希釈して用いた。各標準原液を、0.5 mL ずつ正確に 5 mL 容メスフラスコに移して混合し、繊維製品及び水性接着剤の分析ではアセトンで、油性塗料の分析ではヘキサンで希釈定容し、サロゲート物質混合標準溶液とした (10 µg/mL)。

TeBT-d₃₆ は 10 mg を正確に秤り取り、ヘキサンで正確に 10 mL に定容して標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。その溶液をヘキサンで正確に希釈して 10 µg/mL となるように調製した。

5. 分析操作

5-1. 繊維試料 繊維試料の分析操作を Fig. 1 に示した。前述のように繊維試料は約 1 g の試料に所定の有機錫が添加されているので、この試料を細切してすべて遠心管に入れた (試料重量については、最後の定量値計算の際には 1 g とした)。その後、サロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製されたアセトン溶液 100 µL、塩酸 0.4 mL 及びアセトン 15 mL を加えて 5 分間振とうした。さらに、ヘキサン 30 mL を加えて 30 分間振とうした後に遠心分離し、繊維を採らないように上清を採取した。次に、アセトン/ヘキサン (3/7=v/v) 混液 30 mL を加えて 30 分間振とうした後、ガラスフィルター付き漏斗 (例: G3) で吸引ろ過して溶液を集めた。残渣をアセトン/ヘキサン混液で洗い込み、初めの上清と合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約 2 mL に定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-2. 水性接着剤試料 水性接着剤試料の分析操作を Fig. 1 に示した。配付試料をガラス棒など

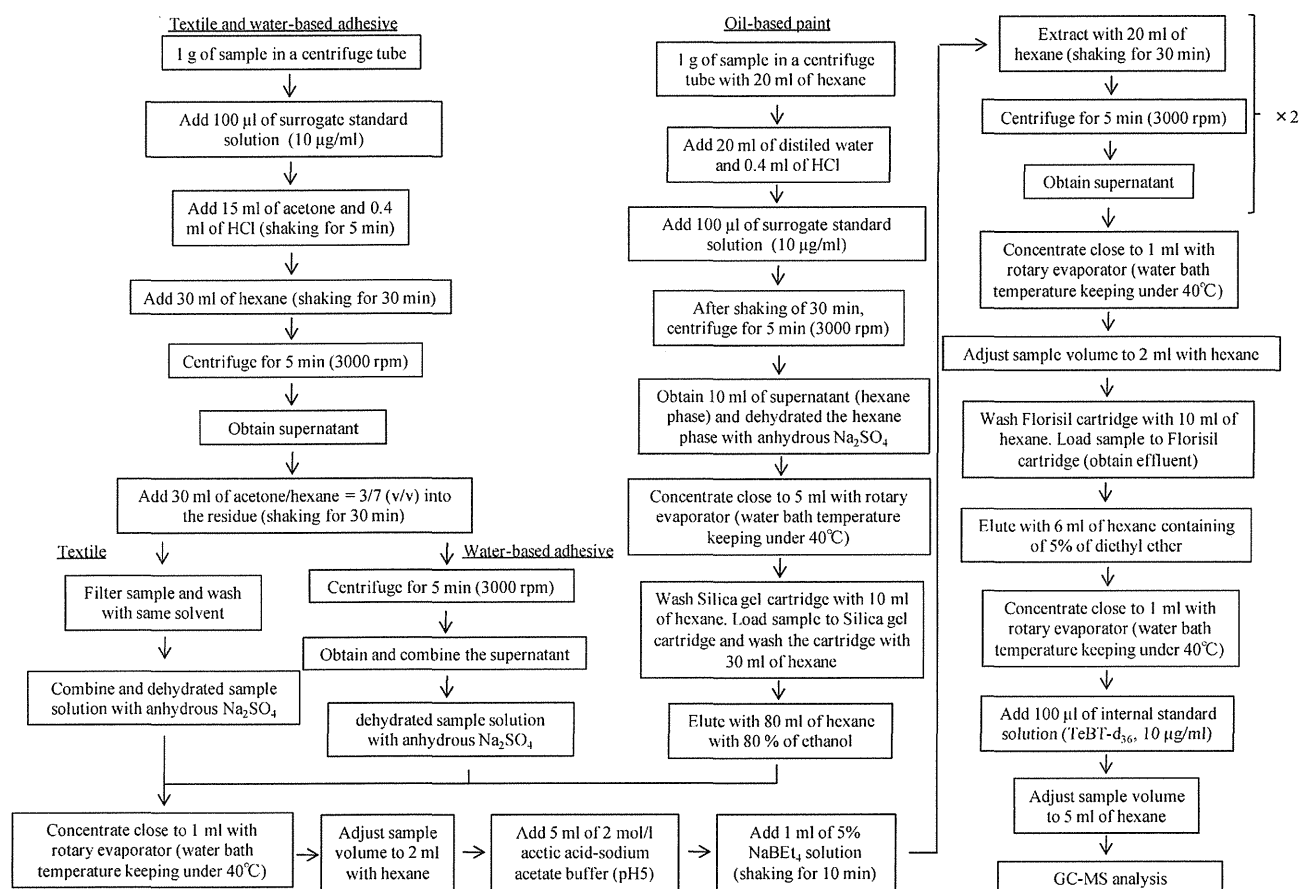


Fig. 1. Scheme of Analytical Methods for Textile Products, Water-based Adhesive and Oil-based Paint

でしっかりと攪拌してから遠心管に1g秤り取った。そこに、サロゲート物質が10 µg/mLの濃度で含まれるように調製されたアセトン溶液100 µL, アセトン15 mL及び塩酸0.4 mLを加えて5分間振とうした。その後、ヘキサン30 mLを加えてさらに30分間振とうした後に遠心分離して上清を採取した。もう一度、アセトン/ヘキサン(3/7=v/v)混液30 mLを加えて30分間振とうした後、遠心分離し上清を採取し初めの上清と合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約2 mLに定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-3. 油性塗料試料 油性塗料試料の分析操作をFig. 1に示した。配付試料をガラス棒などでしっかりと攪拌してから、あらかじめヘキサン20 mLの入っている遠心管に1gを秤り取った。そこに精製水20 mL及び塩酸0.4 mLを加えた。さらに、サロゲート物質が10 µg/mLの濃度で含まれるように調製されたヘキサン溶液100 µLを加えた後に30分間振とう抽出した。その後、遠心分離して

ヘキサン相10 mLを採取し、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。そして、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサン10 mLでコンディショニングされたシリカゲルカラムに試料溶液を負荷した。この試料を負荷したシリカゲルカラムをヘキサン30 mLで洗浄した後、80%エタノール含有ヘキサン80 mLで溶出した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約2 mLに定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-4. 誘導体化及びGC-MS試験用溶液の調製

試料溶液が入っている遠心管に、2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液5 mLを加えた後、5% NaBEt₄溶液を1 mL加えて10分間振とうして誘導体化した。誘導体化後、ヘキサン20 mLを加えて30分間振とうし、遠心分離して上清を採取した。この操作をもう一度行い、得られたヘキサン溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、2 mLに定容した。この溶液をあらかじめヘキサン10 mLでコンディショニングしたフロリジルカラムに負荷し、流出液を採取した。さらに、5%ジエチルエーテル

含有ヘキサン溶液 6 mL で溶出した。その後、得られた溶液をロータリーエバポレーターで約 1 mL まで濃縮した後、サロゲート物質の回収率評価用としての TeBT-d₃₆ を 10 µg/mL 含むヘキサン溶液 100 µL 加え、全体をヘキサンで 5 mL に定容し、その溶液の一部を GC-MS にて測定した。

5-5. 検量線 各濃度の検量線用標準溶液を 1 mL ずつ 50 mL 容遠心管にそれぞれ移し、そこにサロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製した溶液（繊維及び水性接着剤試料ではアセトン溶液、油性塗料試料ではヘキサン溶液）100 µL を加えた。そして 2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL を加え軽く攪拌した後に、5% NaBEt₄ 溶液を 1 mL 加えて 10 分間振とうして誘導体化した。その後、ヘキサン 20 mL で 2 回抽出し、得られたヘキサン溶液をロータリーエバポレーターで約 1 mL まで濃縮した。そこに、サロゲート物質の回収率評価用として 10 µg/mL となるようにヘキサンで希釈調製された TeBT-d₃₆ を 100 µL 加え、全体をヘキサンで 5 mL に定容し、その溶液の一部を GC-MS にて測定した。このとき、検量線範囲は注入時濃度として 0.01–2 µg/mL であり、各サロゲート物質及び TeBT-d₃₆ 濃度は 0.2 µg/mL である。なお、誘導体化以降の操作はフロリジルカラムによる精製を除き試料の場合と同様である。

定量は各サロゲート物質を内部標準物質とし、内部標準法で検量線を作成して行った。また、サロゲート物質の回収率を確認するため TeBT-d₃₆ に対する各サロゲート物質の検量線でのピーク面積と試料から得られたピーク面積の比を別途求めた。²³⁾

5-6. GC-MS 条件 各機関で、可能な限り条件を統一して分析を行った。ただし、各機関では使用した装置がそれぞれ異なっており、装置によって

は GC のカラム温度条件などで同一条件の設定ができない場合があったため、そのような場合は適宜装置に適した条件に変更した。カラムには 5% フェニルメチルシリコンがコーティングされた溶融シリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25 µm) を用いた。キャリアーガスには He を用い、流量は 1.0 mL/min に設定した。注入口、トランスファーライン及びイオンソース温度はそれぞれ 270 °C (機関 A ではホットニードル法を用い 250 °C に設定)、280 及び 230 °C に設定し、スプリットレスモードで試料溶液を 1 µL 注入した。カラムオープンプログラムは初期温度 60 °C で 2 分間保持させた後、130 °C まで 20 °C/分 で昇温させた。その後、210 °C まで 10 °C/分、260 °C まで 5 °C/分 で昇温した後、300 °C まで 10 °C/分 で昇温して最終温度で 5 分間保持した (機関 B では、初期温度 50 °C で 1 分間保持後、220 °C まで 10 °C/分 で昇温した。その後、260 °C まで 5 °C/分 で昇温した後、280 °C まで 20 °C/分 で昇温して最終温度で 5 分間保持した)。²⁵⁾ イオン化法は電子イオン化 (Electron Ionization: EI) 法、イオン化電圧は 70 eV とした。測定は選択イオン検出 (Selected Ion Monitoring: SIM) モードにて行った。各測定対象物質の定量・定性イオンなどについては Table 1 に記載した。

結果及び考察

1. 試験法の改良 本報告で用いた分析方法は、われわれがこれまでに報告した繊維製品、水性接着剤及び塗料、油性接着剤及び塗料中の有機錫化合物の分析法^{7,22,23)} を基にしている。これらの報告では、誘導体化の振とう時間などの条件や最終液量が異なっていたため、誘導体化以降の操作の統一を図った。また、油性接着剤及び塗料に関しては、既

Table 1. GC Retention Times, Quantifying and Qualifying Ions of the Organotin Compound

Organotin compound	Abbreviation	Retention time ^a (min)	Quantifying ion (<i>m/z</i>)	Qualifying ion (<i>m/z</i>)
Tributyltin	TBT	10.57	263	261
Triphenyltin	TPT	20.33	351	349
Tributyltin-d ₂₇	TBT-d ₂₇	10.37	318	316
Triphenyltin-d ₁₅	TPT-d ₁₅	20.21	366	364
Tetrabutyltin-d ₃₆	TeBT-d ₃₆	11.80	318	316

^a Case of laboratory A.

報⁷⁾では過去の使用実態²⁶⁾に合わせて 20–200 $\mu\text{g/g}$ で添加回収試験を行っているが、今回は、現行法で求められているフレームレス AAS の検出限界値 (錫として 0.2 $\mu\text{g/g}$, TPT 及び TBT として 0.65 及び 0.55 $\mu\text{g/g}$)²⁷⁾以下の濃度に関して検討するために、最少濃度を 0.1 $\mu\text{g/g}$ とした。そこで、予備試験として既報⁷⁾の油性試料のシリカゲルカラムを用いた精製法 (20% エタノール含有ヘキサン 20 mL で溶出) について 0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料を分析することを想定して、標準溶液の回収率を調べたところ、TPT 及び TBT はともにほとんど回収できなかった。このシリカゲルカラムによる精製は誘導体化前に実施しており、TPT 及び TBT は極性が比較的強い塩化物として存在しているため、低濃度の TPT 及び TBT はシリカゲルカラムから溶出し難かったと考えられた。そこで、溶出溶媒のエタノール組成及び溶出液量を変化させて検討したところ、80% エタノール含有ヘキサン 80 mL で溶出した場合、TPT 及び TBT はともに 90% 以上の回収率を得ることができた。その際、TPT は 0–40 mL, TBT は 20–80 mL の画分にそれぞれ溶出した。この結果を踏まえて油性塗料試料の分析では溶出溶媒には 80% エタノール含有ヘキサン 80 mL を用いた。

2. 試験結果 今回用いた試料は、試料作製後直ちに国立医薬品食品衛生研究所 (機関 A) において TPT 及び TBT 濃度を測定した (Table 2)。各試料は繰り返し 3 回測定した。その結果、繊維及び油性塗料試料の 10 $\mu\text{g/g}$ (TPT) の分析値は 8.4 及び 7.6 $\mu\text{g/g}$ とやや低い値を示したものの、試料作製方法などを勘案すると概ね設定濃度と一致していると考えられた。その変動係数 (CV) も水性接着剤試料の 10 $\mu\text{g/g}$ (TBT) の 13% を除けばすべての試料で 10% 以下となり、試料の均一性には問題はなかった。

各機関の分析値の一覧を Table 2 に示した。検量線については、注入時濃度 0.01–2 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示した機関と、2 次曲線化した機関とがあった。これは、測定に用いた GC-MS 装置の違い及びその装置状態が影響していると考えられた。今回は、各機関でそれぞれ適切な検量線を用いて定量した。機関 A の検量線を代表例として Fig. 2 に示した。また、繊維試料、水性接着剤試料及び油性塗料試料 (1.0 $\mu\text{g/g}$) から得られた代表的なク

ロマトグラムを Fig. 3 に示した。各機関における TPT 及び TBT の回収率を、「回収率 (%) = 100 × (機関 B–F の測定値) / (機関 A の測定値)」として計算した。

繊維試料では、TBT の回収率は配付前の濃度に対して機関 B 及び F の 0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料でそれぞれ 123% 及び 66% となったが、それ以外は 70–120% の範囲内であった。CV 値も低濃度で若干 10% を超え

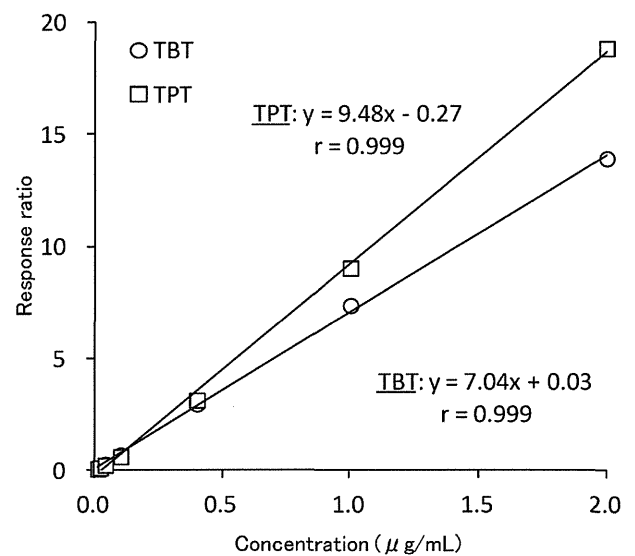


Fig. 2. Calibration Curves of TPT and TBT (laboratory A)

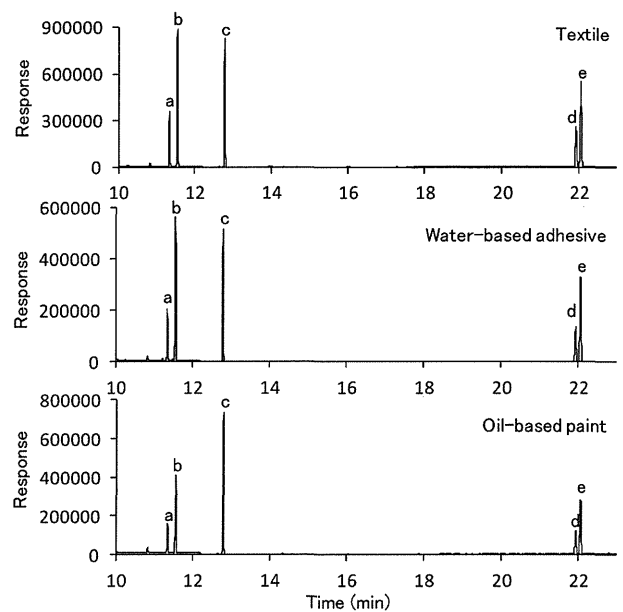


Fig. 3. Total Ion Chromatograms (SIM Mode) Obtained from Textile, Water-based Adhesive, and Oil-based Paint (added amount: 1.0 $\mu\text{g/g}$, laboratory A)

a: TBT-d₂₇, b: TBT, c: TeBT-d₃₆, d: TPT-d₁₅, e: TPT.

Table 2. Average (Ave: $\mu\text{g/g}$) and Coefficients of Variation (CV: %) of Organotin Compounds Measured in Each Laboratory ($n=3$)

Sample	Setting concentration		TBT						TPT					
			A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
Textile	0.1 $\mu\text{g/g}$	Ave	0.12	0.15	0.13	0.13	0.091	0.079	0.10	0.078	0.12	0.20	0.0071	0.017
		CV	0.095	6.4	4.0	2.5	15	19	1.9	11	1.2	2.1	38	6.7
	1.0 $\mu\text{g/g}$	Ave	0.98	0.93	0.86	0.94	0.90	0.85	0.85	0.48	0.35	0.48	0.32	0.33
		CV	2.1	1.2	2.5	2.0	1.1	7.8	1.4	1.9	3.0	1.5	3.1	13
	10 $\mu\text{g/g}$	Ave	10	9.5	8.8	9.4	9.3	11	8.4	7.6	5.1	5.9	5.8	5.6
		CV	7.8	0.69	5.7	0.80	2.4	3.2	3.0	3.4	5.0	1.4	2.6	1.7
Water-based adhesive	0.1 $\mu\text{g/g}$	Ave	0.12	0.15	0.15	0.14	0.10	0.091	0.13	0.14	0.19	0.26	0.14	0.12
		CV	5.2	0.65	1.1	1.5	3.4	15	0.92	1.3	1.2	1.2	4.2	0.57
	1.0 $\mu\text{g/g}$	Ave	1.1	1.0	1.0	1.0	0.97	1.0	0.89	0.97	0.93	0.90	0.93	0.80
		CV	9.0	1.3	1.4	0.70	2.6	0.75	3.2	1.3	1.3	0.90	0.85	1.0
	10 $\mu\text{g/g}$	Ave	13	10	10	10	9.4	9.9	10	9.5	8.4	9.1	8.5	8.3
		CV	13	0.069	2.2	0.94	3.2	1.4	3.7	2.3	2.3	0.87	1.4	1.0
Oil-based paint	0.1 $\mu\text{g/g}$	Ave	0.14	0.17	0.16	0.16	0.11	0.17	0.15	0.10	0.13	0.18	0.0071	0.039
		CV	2.7	2.3	0.18	2.0	2.7	15	5.0	3.9	2.5	0.92	9.2	4.0
	1.0 $\mu\text{g/g}$	Ave	1.0	1.1	0.97	1.0	0.96	1.0	1.1	0.43	0.27	0.36	0.32	0.21
		CV	2.1	1.6	4.4	1.3	1.6	3.9	0.60	1.0	5.3	1.0	0.22	0.35
	10 $\mu\text{g/g}$	Ave	9.9	11	8.6	10	10	10	7.6	3.7	1.3	2.2	1.4	1.5
		CV	0.88	0.42	2.8	1.6	1.7	1.9	0.53	1.3	0.49	0.86	1.3	9.9

る値があったものの、全体的には10%以下となり良好な精度が得られた。一方で、TPTについては各試料のほとんどで70%未満となり、配付前に比べて濃度が低下する傾向が認められた。ただし、繊維試料中のTPTのCV値は0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料では機関B及びE、1.0 $\mu\text{g/g}$ 試料では機関Fで10%を超えたものの、全体的には10%以下となり、良好な精度が得られた。

水性接着剤試料では、TBTの回収率は配付前の濃度に対して機関B及びCの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で120%を若干超えたが、それ以外は70-120%以内であった。CV値も2検体のみ10%をやや超える値があったものの、ほとんどは5%以下となり、非常に良好な精度が得られた。また、TPTについても機関C及びDの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で、配付前と比べて146%及び202%となったが、それ以外では80-110%以内であった。TPTのCV値はすべての機関で5%以下となり非常に良好な精度が得られた。

油性塗料試料では、TBTの回収率は配付前の濃度に対して機関B及びFの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で120%を若干超えたが、それ以外は80-120%以内であった。CV値も機関Fの0.1 $\mu\text{g/g}$ で15%となったもののそれ以外は5%以下となり、非常に良好な精度が得られた。一方、TPTについては繊維試料と同様に、ほとんどの機関で配付前に比べて濃度が大幅に低下していた。ただし、CV値はすべての機関で10%以下となり、分析精度は良好であった。

以上の結果より、水性接着剤中のTPT及び全試料のTBTについては概ね配付前の濃度と同じ値を得ることができた。また、濃度が低下したTPTの分析値も含め、繰り返し3回分析時のCV値はそのほとんどが10%以下と小さく、本試験法は十分な精度が確保できると考えられた。

一方、繊維及び油性塗料試料のTPT濃度については、試料配付前の濃度に比べて大幅に低下する傾向が認められ、その傾向は油性塗料で特に顕著に認められた。そこで、分析操作中のサロゲート物質の挙動について調べるため、サロゲート物質の回収率を検量線作成時のサロゲート物質とTeBT-d₃₆との面積比に対する試料中のそれらの面積比から求めたところ (Table 3)、機関A及びCで非常に高いか又は低い値がいくつかあったものの、その他は良好な回収率を示し、サロゲート物質の回収率が著しく

低下することはなかった。この結果から、分析操作中にTPTが大幅に損失した可能性は低いと考えられた。また、本試験法ではサロゲート物質による補正を行っているため、各機関間での回収率の差異による影響は軽減されていると考えられる。TPTは脱フェニルして分解し易いことが報告されている。^{14,23,28)} 今回の試験では、配付試料の保管は実際の家庭用品の保管と同様に室温・暗所にて行い、各機関での分析時期も配付前の分析時から3-5ヵ月経過していた。機関B-Fの中で最も初めに分析を行った機関Bは配付3ヵ月後に分析を実施したが、このとき既に脱フェニルによると考えられる繊維及び油性試料中のTPT濃度の低下が認められており、²⁵⁾ 機関B-Fで観察された繊維及び油性塗料中のTPT濃度の低下は、試料保存中にTPTが脱フェニル分解したことによるものと考えられた。機関FではGC-MS分析時にTPT及びTBT以外の有機錫化合物についてモニターしたところ、繊維試料中にジフェニル錫化合物(DPT)の存在が確認された (Fig. 4)。一方、油性塗料試料ではDPTの存在は確認されなかったが、油性塗料の分析では誘導体

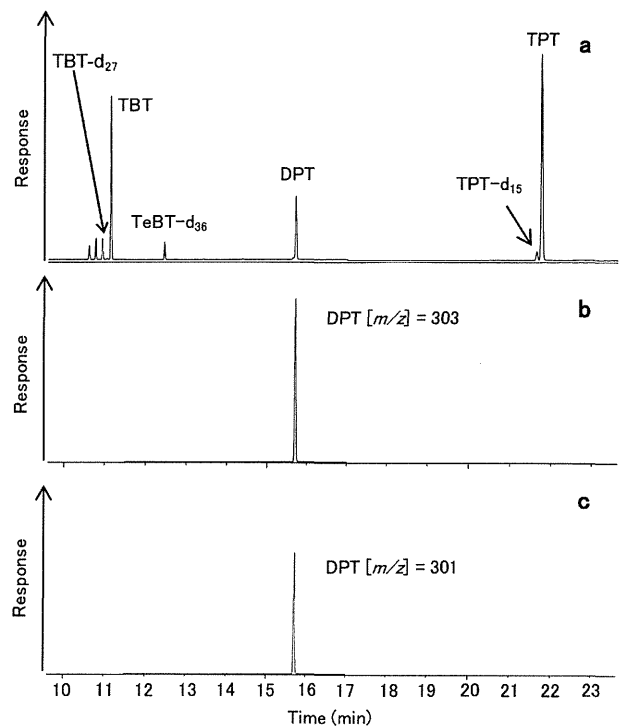


Fig. 4. GC-MS Chromatograms Obtained from the Textile Sample (added amount: 10 $\mu\text{g/g}$, laboratory F)
a: total ion chromatogram (SIM mode including fragment ion of DPT), mass chromatogram of DPT; b: $[m/z] = 303$, c: $[m/z] = 301$.