

3. 塩化ビニリデン試験の性能評価

1) クロマトグラム

塩化ビニリデン標準溶液 (6 $\mu\text{g/g}$ 相当) およびブランク溶液を He 法および N_2 法で測定した。それらのクロマトグラムを図5に示した。

両法ともに、ピーク形状およびピークの分離は良好で、保持時間およびピーク面積に大きな違いはなかった。ブランク溶液では、いずれのキャリアガスにおいても試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図6に示した。両法ともに、検量線は 0.6 ~ 24

$\mu\text{g/g}$ (標準原液添加量 5~200 μL) の範囲で良好な直線性 ($R^2 = 0.9995$ および 0.9993) を示した。また、両法とも規格値 (6 $\mu\text{g/g}$) の 1/10 の濃度である 0.6 $\mu\text{g/g}$ まで定量可能であった。

3) 真度および精度

1日2試行で5日間測定した時の定量値および解析結果を表3に示した。He法および N_2 法の真度は102.2および103.0%と良好であった。また、 RSD_r は8.0および8.1%、 RSD_i は10.9および9.0%であり、両法ともに塩化ビニル試験の値と比べるとやや大きかったが、キャリアガスの違いによる差は認められず、目標値を満たしていた。

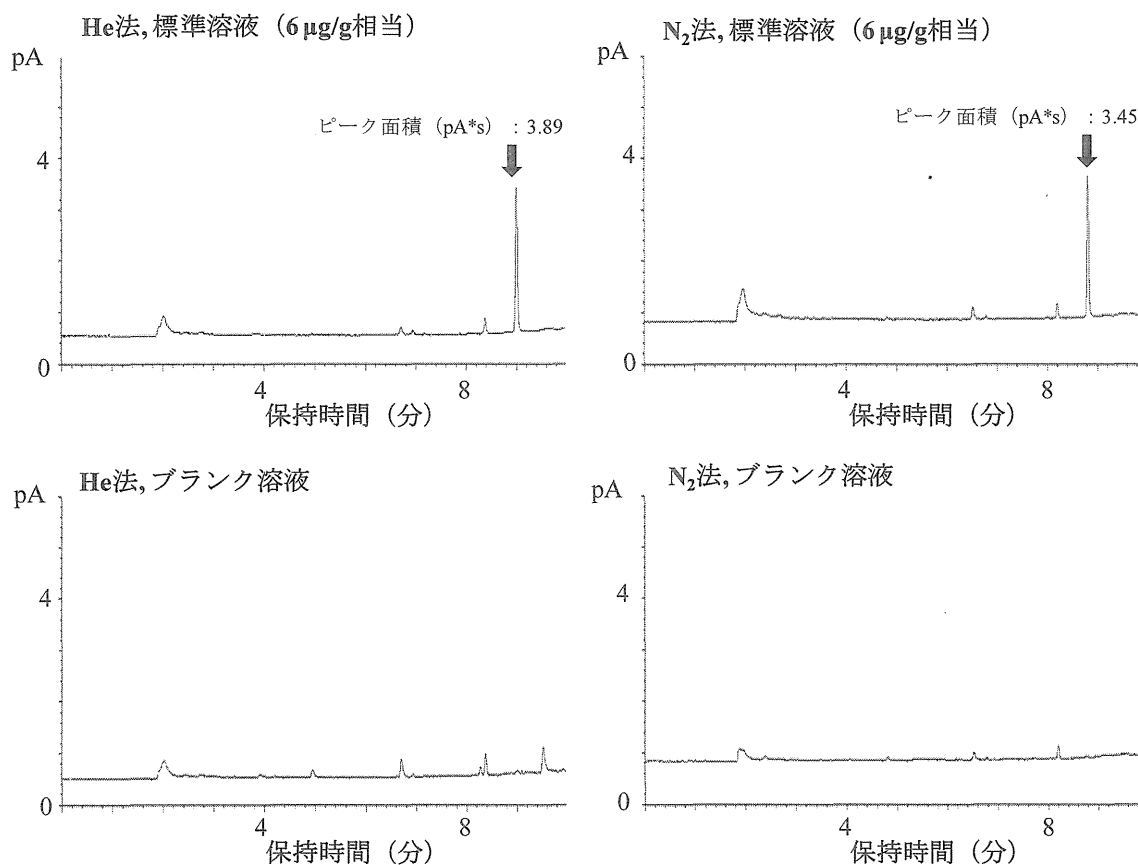


図5 塩化ビニリデン試験のGC-FIDクロマトグラム

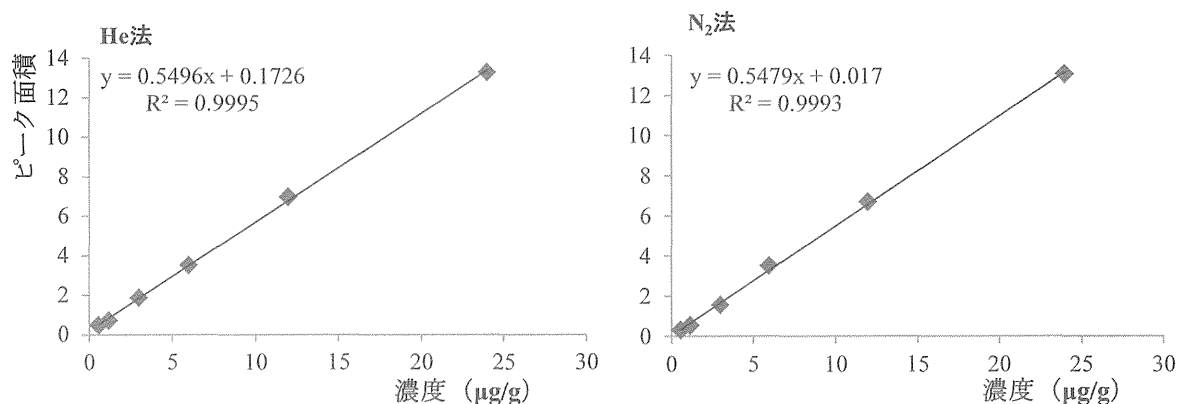


図6 塩化ビニリデンの検量線

表3 塩化ビニリデン試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
He法	5.85	7.31	5.64	6.19	5.85	102.2	8.0	10.9
	6.55	6.71	5.46	5.19	6.55			
N ₂ 法	6.68	6.14	5.82	5.74	5.88	103.0	8.1	9.0
	6.85	5.67	5.49	7.09	6.43			

RSD_r: 併行精度、RSD_i: 室内再現精度

4. メタクリル酸メチル試験の性能評価

1) クロマトグラム

メタクリル酸メチル標準溶液 (15 µg/mL) およびブランク溶液を He 法および N₂ 法で測定した。それらのクロマトグラムを図7に示した。

両法ともに、ピーク形状は良好で、保持時間に違いはなかった。また、今回の条件では分離できたが、N₂法ではメタクリル酸メチルピーク直前に検出されるピークがブロードとなったため、カラムやガス流量等によっては分離しない可能性がある。また、ピーク面積は He 法に比べ N₂法でやや大きくなった。

ブランク溶液では、いずれのキャリアガスにおいても試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図8に示した。両法ともに、検量線は 2~20 µg/mL の範囲で良好な直線性 (R²= 0.999 および 0.9991) を示した。両法とも規格値 (15 µg/mL) の 2/15 の濃度である 2 µg/mL まで定量可能であったが、N₂法は He 法と比べてピーク面積が大きくなるため、検量線の傾きもやや大きかった。そのため、より低い濃度まで定量することが可能と推定されたが、2 µg/mL 未満では定量性は得られなかった。

3) 真度および精度

1日2試行で5日間測定した時の定量値および解析結果を表4に示した。いずれの性能パラメーターの値も目標値を十分に満たしていたが、N₂法は He 法よりも良好な値を示した。

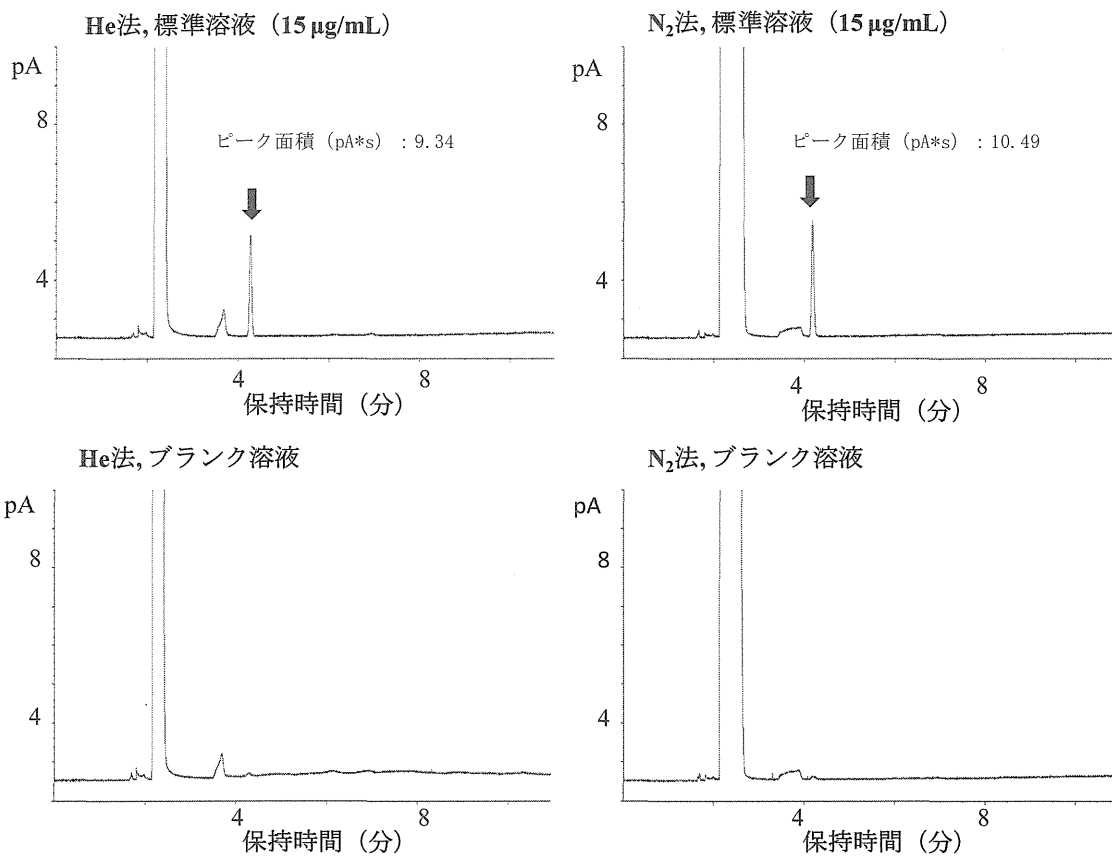


図7 メタクリル酸メチル試験のGC-FIDクロマトグラム

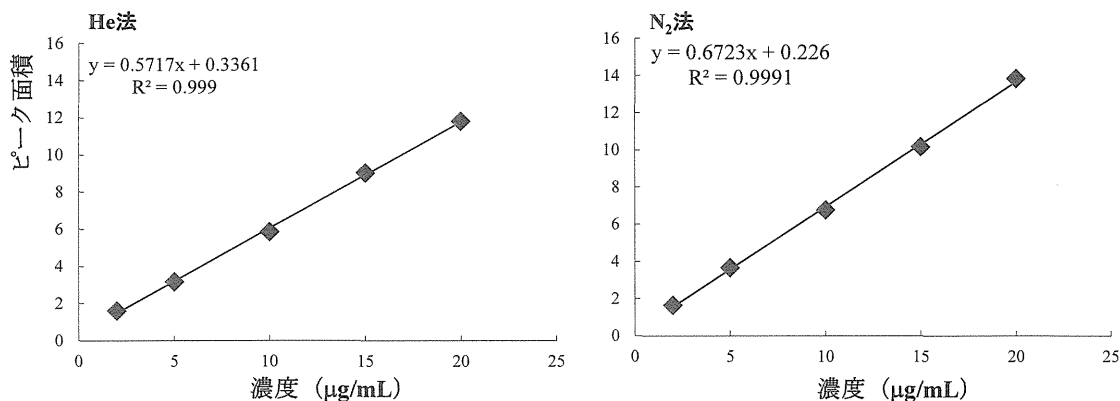


図8 メタクリル酸メチルの検量線

表4 メタクリル酸メチル試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
He法	14.4	14.9	15.0	14.6	14.4	96.5	3.5	3.5
	14.4	13.5	14.3	15.0	14.3			
N ₂ 法	14.6	14.6	14.6	15.2	15.1	99.2	1.7	1.7
	14.8	14.8	15.3	15.0	14.8			

RSD_r : 併行精度、RSD_i : 室内再現精度

5. カプロラクタム試験の性能比較

1) クロマトグラム

カプロラクタム標準溶液 (15 $\mu\text{g/mL}$) およびブランク溶液を He 法および N_2 法で測定した。それらのクロマトグラムを図 9 に示した。

N_2 法では、ピークにリーディングがみられ、ピーク面積がやや小さかったが、保持時間はほぼ同じであった。ブランク溶液では、試料由来と考えられる微小なカプロラクタムのピークが確認されたが、その他の試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図 10 に示した。両法ともに、検量線は 5~30 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性 ($R^2 = 0.9994$ および

0.9995) を示した。また、両法とも規格値 (15 $\mu\text{g/mL}$) の 1/3 の濃度である 5 $\mu\text{g/mL}$ まで定量可能であった。

3) 真度および精度

1 日 2 試行で 5 日間測定した時の定量値および解析結果を表 5 に示した。He 法および N_2 法の性能パラメーターの値はいずれも目標値を満たしていたが、 N_2 法では He 法より劣っていた。特に、真度は 107.3% とやや高く、全体的に定量値は添加量より約 1~2 $\mu\text{g/mL}$ 高かった。カプロラクタムの真度は、添加溶液からブランク溶液のピークを差し引いて算出したが、ブランク溶液のピーク面積は定量下限値の 1/2 以下であるため定量性が低く、真度に影響を及ぼしたと推察された。

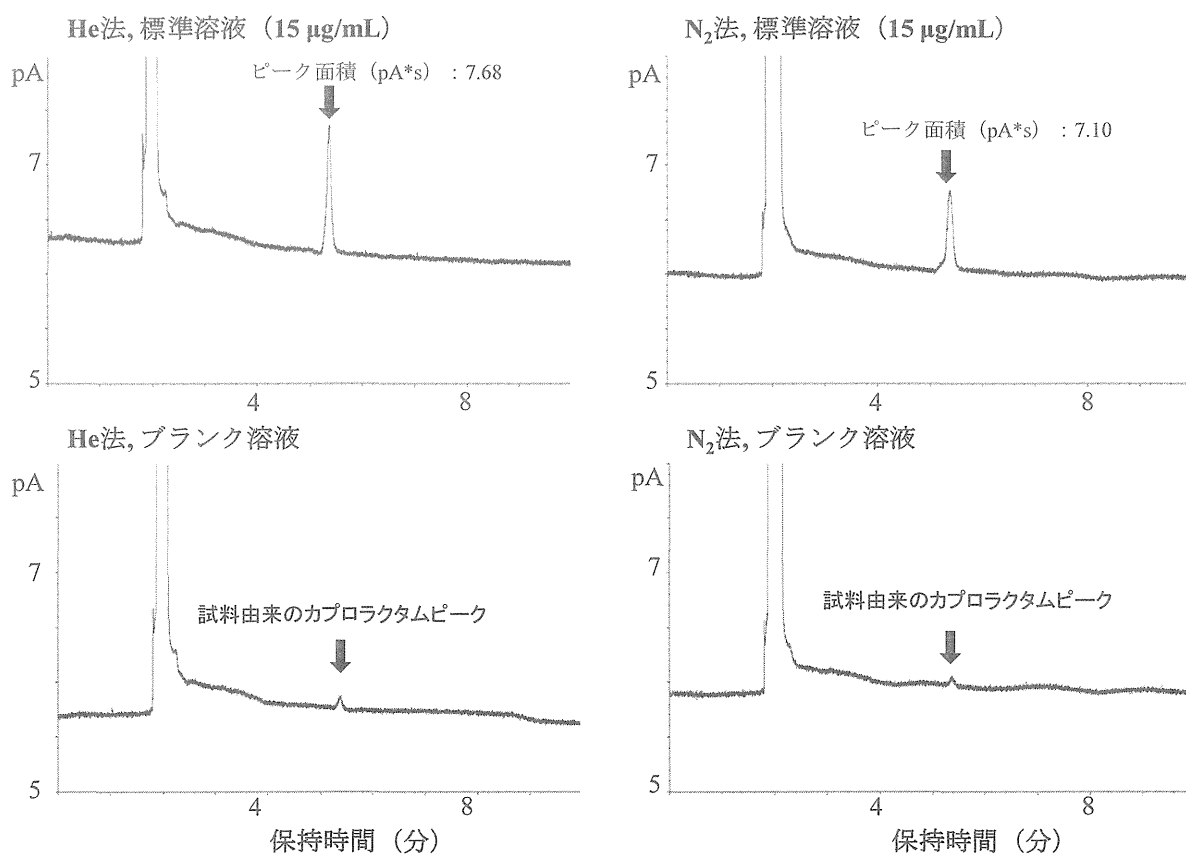


図 9 カプロラクタムのGC-FIDクロマトグラム

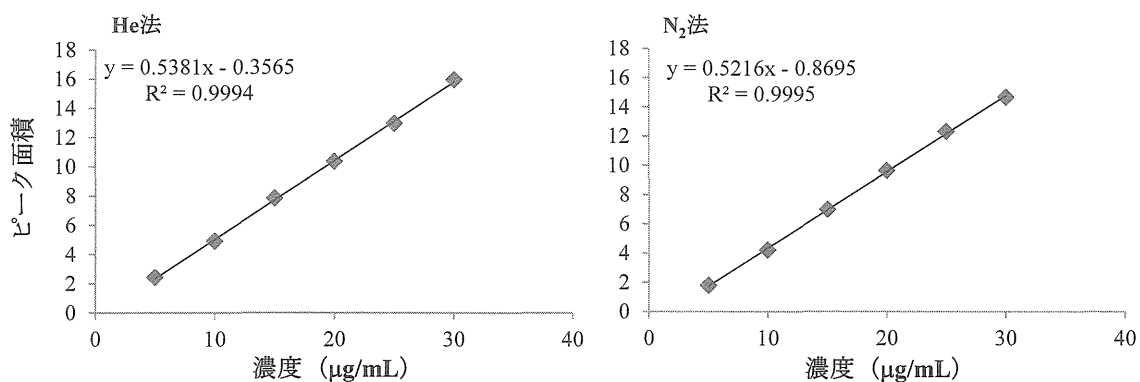


図10 カプロラクタムの検量線

表5 カプロラクタム試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
He法	15.5	15.1	14.7	15.7	15.1	100.4	1.5	2.8
	15.3	14.9	14.5	15.3	14.6			
N ₂ 法	16.9	15.6	14.4	16.6	15.6	107.2	2.8	6.3
	17.3	15.9	14.9	17.0	16.7			

RSD_r: 併行精度、RSD_i: 室内再現精度

6. エピクロルヒドリン試験の性能評価

1) クロマトグラム

エピクロルヒドリン標準溶液 (0.5 µg/mL) およびブランク溶液を He 法および N₂ 法で測定した。それらのクロマトグラムを図 11 に示した。

保持時間およびピーク面積に違いはなかったが、N₂ 法ではややブロードなピークとなった。ブランク溶液では、いずれのキャリアーガスにおいても試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図 12 に示

した。両法ともに、検量線は 0.25~5 µg/mL の範囲で良好な直線性 (R² = 0.9997 および 0.9996) を示した。また、両法とも規格値 (0.5 µg/mL) の 1/2 の濃度である 0.25µg/mL まで定量可能であった。

3) 真度および精度

1日2試行で5日間測定した時の定量値および解析結果を表6に示した。He法の性能パラメーターの値はいずれも良好で目標値を十分満たしていた。N₂法についても目標値を満たしていたが、真度、精度ともにHe法より劣っていた。

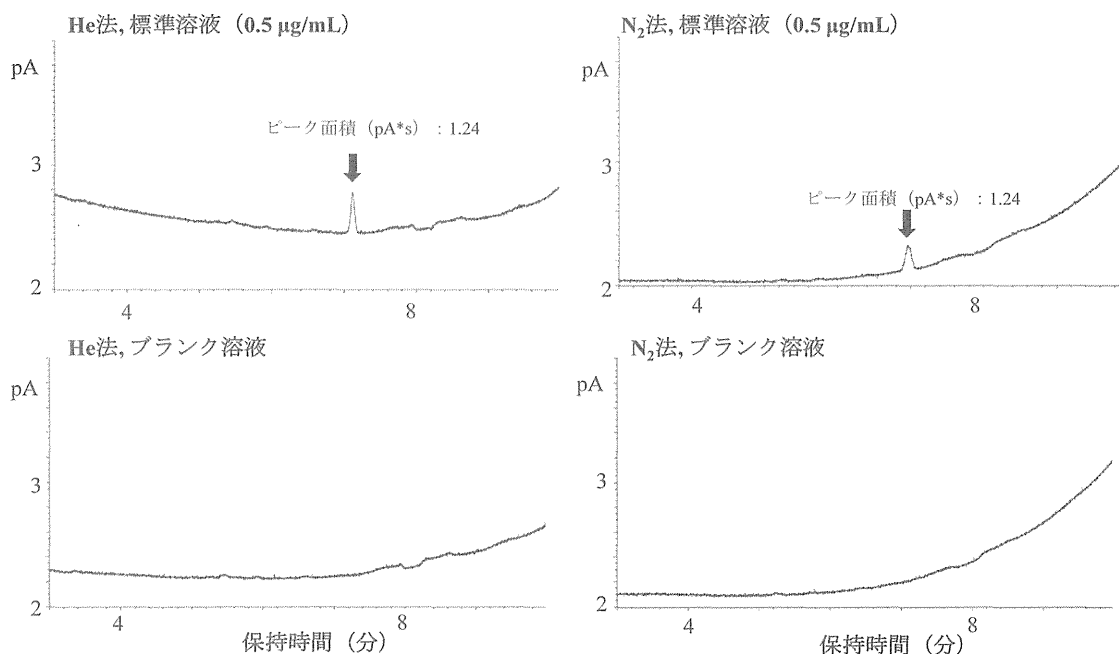


図 1.1 エピガロルヒドリンのGC-NPDクロマトグラム

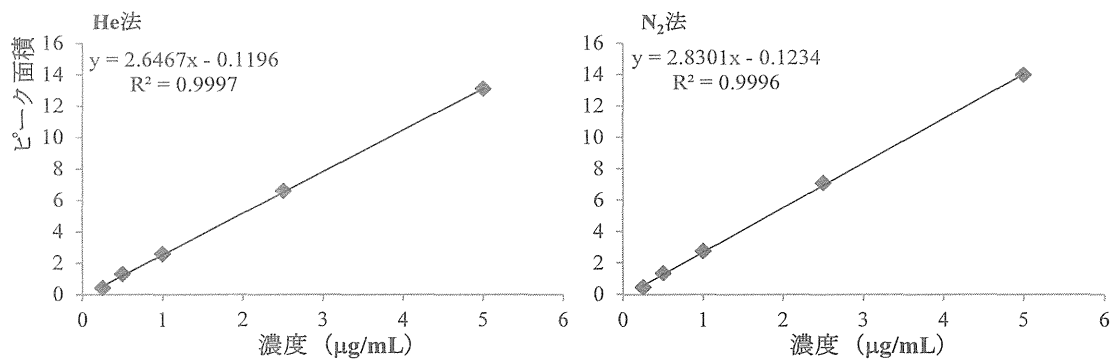


図 1.2 エピガロルヒドリンの検量線

表 6 エピガロルヒドリン試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

試験法	定量値 (μg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
He法	0.52	0.44	0.56	0.49	0.54	100.0	3.5	6.0
	0.48	0.46	0.48	0.50	0.52			
N ₂ 法	0.46	0.42	0.57	0.51	0.52	96.6	5.5	10.3
	0.44	0.43	0.50	0.48	0.51			

RSD_r : 併行精度、RSD_i : 室内再現精度

7. アミン類試験の性能評価

1) クロマトグラム

アミン類標準溶液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$) およびブランク溶液のクロマトグラムを図 1 3 に示した。

各成分の保持時間およびピーク形状に大きな違いはなかったが、 N_2 法におけるピーク面積は、He法と比べてそれぞれ 1.5 および 2 倍に増加した。また He 法と N_2 法では、ベースラインの形状が異なっていた。

ブランク溶液のクロマトグラムから両法の実験性を確認したところ、いずれの方法でもトリエチルアミンの保持時間付近に複数のピークが認められた。また、 N_2 法ではベースラインが標準溶液と大きく異なっていた。このため、いずれのキャリアガスにおいてもトリエチルアミンの定性は注意深く行う必要があ

った。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図 1 4 に示した。He 法では 0.2~1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲でほぼ良好な直線性 ($R^2 = 0.9998$ および 0.9962) を示した。 N_2 法の検量線は He 法に比べ傾きが大きかったが、直線性は 0.9931 および 0.9956 であり、He 法よりやや悪かった。しかし、両法とも 0.2 $\mu\text{g/mL}$ まで定量可能であった。

3) 真度および精度

1 日 2 試行で 5 日間測定した時の定量値および解析結果を表 7 に示した。 N_2 法は、He 法と比べて定量値がやや高い傾向がみられた。しかし、それ以外はキャリアガスによる違いはなく、両法ともにいずれの性能パラメーターの値も目標値を満たしていた。

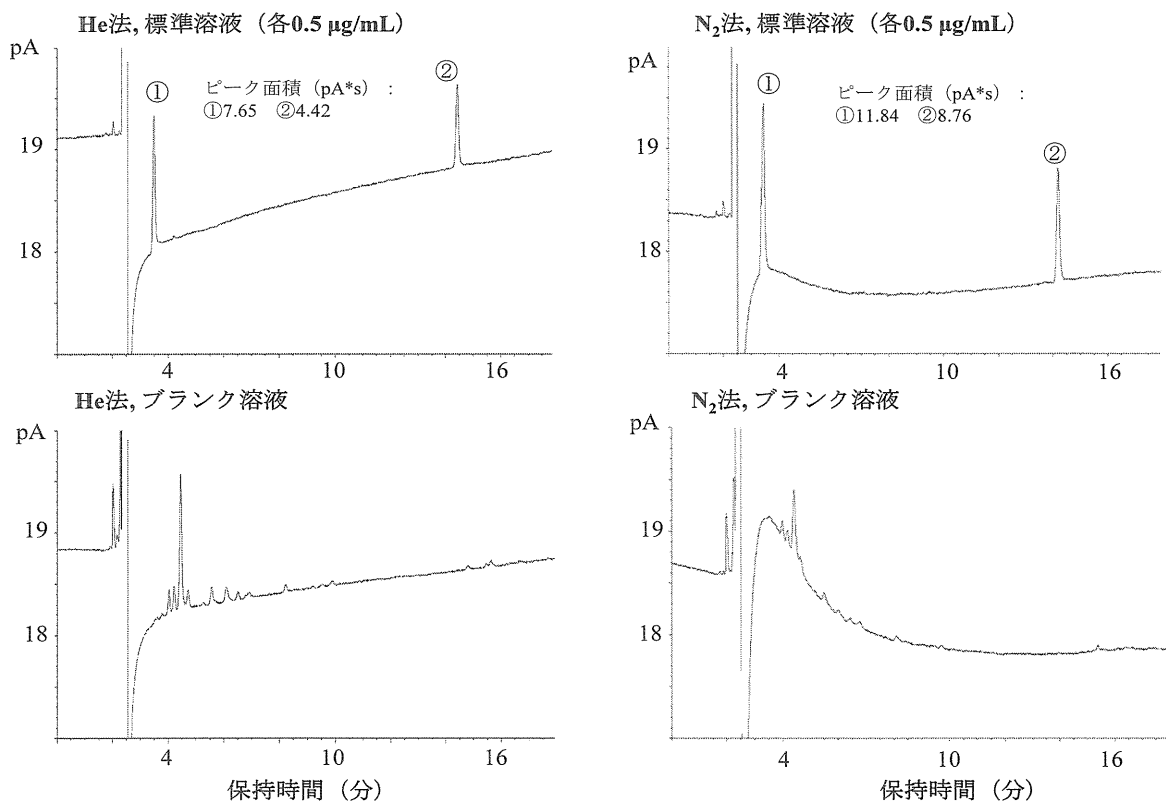


図 1 3 アミン類のGC-NPDクロマトグラム
①トリエチルアミン ②トリブチルアミン

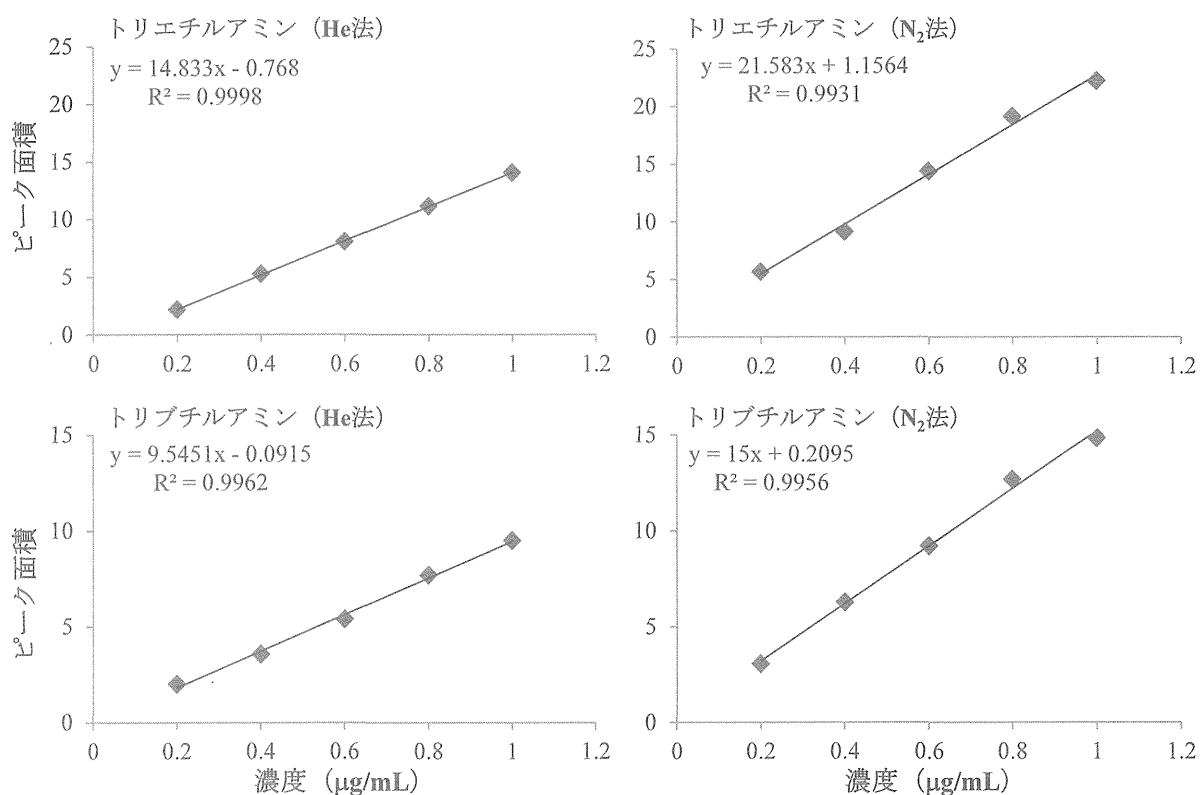


図14 アミン類の検量線

表7 アミン類試験のGC-NPD測定における各成分の真度および精度

物質	試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
TEA	He法	0.51	0.48	0.47	0.52	0.46	97.4	1.9	4.3
		0.49	0.48	0.47	0.51	0.48			
	N ₂ 法	0.53	0.51	0.50	0.48	0.53	101.6	2.9	4.5
		0.53	0.48	0.48	0.51	0.53			
TBA	He法	0.51	0.50	0.50	0.47	0.47	98.6	3.1	4.7
		0.52	0.53	0.47	0.47	0.49			
	N ₂ 法	0.54	0.52	0.52	0.55	0.50	104.0	3.4	4.6
		0.55	0.53	0.51	0.50	0.48			

TEA：トリエチルアミン、TBA：トリブチルアミン

RSD_r：併行精度、RSD_i：室内再現精度

D. 結論

食品衛生法における器具・容器包装の規格試験法のうち、GC-FID および GC-NPD を用いる試験について、キャリアーガスとして He および N₂を用い、同一装置、同一条件で測定を行い、キャリアーガスの違いによる影響を確認した。

GC-FID を用いる揮発性物質、塩化ビニル、塩化ビニリデン、メタクリル酸メチル、カプロラクタムおよびエピクロルヒドリン試験においては、N₂をキャリアーガスとして用いると揮発性物質試験ではピークのテーリングが、カプロラクタム試験ではピークのリーディングが認められたが、適否判定に支障をきたすほどの変化ではなかった。一方、塩化ビニル、塩化ビニリデン、メタクリル酸メチルおよびエピクロルヒドリン試験では、キャリアーガスによる違いは認められなかった。ブランク溶液を用いて選択性を確認した結果、いずれの試験においてもクロマトグラムに大きな変化はなく、妨害ピークも検出されなかった。また、各試験法について性能評価を行ったところ、いずれもキャリアーガスに関わらず、規格試験法として十分な性能を示した。

一方、キャリアーガスに N₂が規定されていない GC-NPD を用いたアミン類試験では、各成分の保持時間に違いはなかったが、ベースラインの形状が異なり、ブランク溶液でトリエチルアミンの保持時間付近に複数のピーク

が認められたため、慎重に定性を行う必要があった。一方、いずれのキャリアーガスにおいても性能パラメーターは目標値を満たしており、N₂を用いた GC-NPD はアミン類の定性試験の代替試験法として適用可能であると考えられた。

以上のことから、ヘリウムの供給不足が再発した際には、大部分の試験法では、キャリアーガスをヘリウムから窒素に変更してもその性能に大きな変化はなく、その他の測定条件を変更せずに試験を実施することが可能であると考えられた。ただし、アミン類試験では、NPD のビーズとして今回用いた Blos ビーズ以外にアルカリビーズやセラミックビーズがあり、また、熱イオン化検出器 (FTD) も使用可能である。これらに関しては今回検討を行っていないため、これらの方法においてキャリアーガスとして N₂を使用する際にはその性能を確認する必要がある。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (平成 20 年 9 月 26 日食安発第 0926001 号) 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン (2008)

F. 健康危害情報

なし

＜その3＞アンチモン及びゲルマニウム溶出試験における ICP-OES を用いた代替試験法の開発

研究代表者 六鹿 元雄 国立医薬品食品衛生研究所
 研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所
 研究協力者 田中 秀幸 (独) 産業技術総合研究所
 研究協力者 城野 克広 (独) 産業技術総合研究所

A. 研究目的

食品衛生法ではポリエチレンテレフタレート (PET) を主成分とする合成樹脂製の器具・容器包装に対して、アンチモン (Sb) 及びゲルマニウム (Ge) の溶出量がそれぞれ 0.05 及び 0.1 µg/mL 以下と規制されている。その試験法は、4%酢酸を浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、その試験溶液中の濃度をフレイム方式原子吸光光度法 (AAS)、電気加熱方式原子吸光光度法 (GF-AAS) または誘導結合プラズマ発光強度測定法 (ICP-OES) で測定し、吸光度または発光強度をそれぞれの標準溶液と比較して適否判定を行うこととされている。このうち、ICP-OES は多くの試験機関が所有しており、Sb と Ge を逐次分析することが可能であるため利便性がよい。しかし、一般的な Sb 及び Ge の定量下限値は規格値と同程度であるため^{1,2)}、装置によっては試験に用いることができない場合がある。このような場合は水素化物発生装置または超音波ネブライザーを併用することにより必要な感度を得ることが可能であるが、これらの付属装置を所有する試験機関やこれらを用いた試験を希望する試験機関は少ない。

平成 25 年度の厚生労働科学研究³⁾において、13 機関で ICP-OES による Sb 及び Ge 試験について試験室間共同試験を行ったが、直接導入による Sb 及び Ge の試験が実施可能であった試験機関は 5 機関のみであった (表 1)。そのため、残りの試験機関では、代替法として試験溶液を蒸発乾固させたのち、4%酢酸に再溶解して 10 倍濃縮とし、ICP-OES で測定

する方法 (蒸発乾固法) により試験を実施した。しかし、半数以上の試験機関が Sb 及び Ge を十分に回収することができず、正確な定量値を得ることができなかった。

また、特定の金属イオンを選択して吸着または除去するためキレート剤を結合させた樹脂や繊維、またはこれらを充填した固相カラムの中には Ge、As、Se、Sn、Sb などの半金属を選択的に吸着するものもあり、キレート繊維を用いた水道水中の微量 Sb の分析法が南澤らにより報告されている⁴⁾。そこで、試験溶液を濃縮する方法または操作法 (濃縮法)

表 1 各試験機関における ICP-OES による Sb 及び Ge の定量下限値

試験機関	定量下限値 (µg/mL)	
	Sb	Ge
1	0.1	0.1
2	0.1	0.1
3	0.5	0.5
4	0.1	0.1
5	0.1	0.1
9	—	0.5
10*	0.025	0.025
11*	0.02	0.02
12*	0.025	0.05
13	0.2	0.2
14*	0.05	0.1
15	0.05	0.05
16*	0.025	0.04

* : 直接導入による試験を実施した試験機関

として、蒸発乾固法及びキレート剤を用いた濃縮法（キレート法）の検討を行い、PET 製器具・容器包装の Sb 及び Ge 溶出試験の ICP-OES を用いた代替法として、これら濃縮法の適用性や問題点を検証した。

一方、大部分の試験機関における ICP-OES の Sb 及び Ge の定量下限値は、規格値に近い値であったため、測定条件や定量法の変更によって試験溶液中の Sb 及び Ge の定量下限値を 1/3～1/2 程度に低減することができれば、ほとんどの試験機関で試験を実施することが可能となる。そこで、試験溶液に Sb 及び Ge の標準溶液を添加して定量する方法（添加法）として、標準添加法及び既知量添加法について検討し、代替法としての適用性を検証した。

B. 研究方法

1. 試薬等

酢酸、アンモニア水（25%）：精密分析用、以上 シグマアルドリッチジャパン（株）製

硝酸：有害金属測定用、純度 60%、比重 1.38、シグマアルドリッチジャパン（株）製

重酢酸（酢酸- d_4 ）：D 含有量 99.96 atom%以上 ISOTEC 社製

水：Milli-Q Gradient A10（ミリポア社製）により精製した超純水

L(+)-酒石酸：試薬特級、和光純薬工業（株）製

Sb 標準液、Ge 標準液、イットリウム（Y）標準液：1000 $\mu\text{g/mL}$ 、以上 和光純薬工業（株）製

キレート繊維：MetaSEP CH-2、ジーエルサイエンス（株）製

フリット付エンプティリザーバー：60 及び 10 mL、ジーエルサイエンス（株）製

シリンジフィルター：ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）製、0.45 μm 、ADVANTEC 製

標準溶液：Sb 標準液及び Ge 標準液を混合し 4%酢酸で適宜希釈して、Sb 及び Ge 濃度

がそれぞれ 0.050 及び 0.10 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製したもの

検量線溶液：Sb 標準液及び Ge 標準液を混合し 4%酢酸で適宜希釈したもの

2. 装置等

ホットプレート：DigiPREP HP SCP、Science 社製

誘導結合プラズマ発光分析計：SPS3500、SII ナノテクノロジー（株）製

誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）：7500c、Agilent Technologies 社製

ヘッドスペース-GC/MS（HS-GC/MS）：7890A GC System、5975C inert XL MSD、7697A Headspace Sampler、以上 Agilent Technologies 社製

3. 測定条件

1) ICP-OES

高周波出力：1.2 kW、キャリアーガス流量：Ar 0.35 L/min、プラズマガス流量：Ar 17 L/min、補助ガス流量：Ar 0.6 L/min、観察方向：横方向、測定波長：206.833 及び 217.581 nm（Sb）、209.426 及び 265.118 nm（Ge）、224.306 nm（Y）

2) ICP-MS

高周波出力：1.3 kW、キャリアーガス流量：Ar 0.7 L/min、プラズマガス流量：Ar 15 L/min、補助ガス流量：Ar 0.2 L/min、測定イオン： m/z 74（Ge）、 m/z 89（Y）、 m/z 121（Sb）

3) HS-GC/MS

①ヘッドスペース条件

オープン温度：90°C、加熱時間：30 分、サンプルループ温度：150°C、トランスファーライン温度：200°C、注入時間：0.5 分、導入量：1 μL

②GC/MS 条件

カラム：DB-FFAP（30 m \times 0.25 mm、0.5 μm ）、オープン温度：50°C（2 分）-10°C/分-150°C-20°C/分-250°C（5 分）、注入口温度：280°C、注入モード：スプリット（100 : 1）、キャリアーガ

ス：He 1.2 mL/分、トランスファーライン温度：250℃、測定モード：SIM、定量イオン： m/z 60 (HOAc)、63 (HOAc- d_4)、確認イオン： m/z 43 (HOAc)、46 (HOAc- d_4)

4. 試験溶液の調製

PET 製使い捨てカップ (400 mL 容) を試料とし、食品衛生法に従い、4%酢酸で 60℃ 30 分間の溶出試験を行い、得られた溶出液をブランク溶液とした。ブランク溶液に Sb 標準液及び Ge 標準液を添加し、各濃度の試験溶液を調製した。ブランク溶液の Sb 及び Ge 濃度は Y を内標準として ICP-MS により定量した。表 2 にブランク溶液及び試験溶液 1~3 の Sb 及び Ge 濃度示した。

5. 濃縮法

1) 蒸発乾固法

①測定溶液の調製

標準溶液 200 mL を結晶皿またはビーカーに採取し、100℃に設定したホットプレート上でほとんど溶媒がなくなるまで加熱した。ビーカーをホットプレートからおろし、余熱で乾固した後、残差に適量の 4%酢酸を加えて溶解した。この液に 4%酢酸を加えて 10 mL に定容し測定溶液とした。

②Sb 及び Ge 濃度の定量

測定溶液及び検量線溶液を ICP-OES で測定し、検量線溶液から得られた各元素の発光強度により検量線を作成し、絶対検量線法で測定溶液中の Sb 及び Ge 濃度を定量し、試験溶液中の濃度を求めた。

2) キレート法

①測定溶液の調製

試験溶液 200 mL にアンモニア水 (25%) 約 11 mL を添加し pH を 7.5~8 に調整した。キレート繊維 1 g を加え、30 分間攪拌 (500 rpm) したのち、フリット付エンプティリザーバー (60 mL) を用いて吸引もしくは加圧方式によりろ過し、キレート繊維を回収した。このキレート繊維を 50 mL の PP 製遠心チューブに移した後、10%硝酸・10%酒石酸 (1:1) 混液 20 mL を加え、10 分間攪拌 (500 rpm) し、フリット付エンプティリザーバー (10 mL) を用いて吸引もしくは加圧方式によりろ過した。さらに、ろ液をシリンジフィルターでろ過したものを測定溶液とした。

②Sb 及び Ge 濃度の定量

測定溶液及び検量線溶液 10 mL に内標準溶液 (Y、40 $\mu\text{g/mL}$) 50 μL を加え ICP-OES で測定し、得られた発光強度から絶対検量線法と内標準法の両法により測定溶液中の Sb 及び Ge 濃度を定量し、試験溶液中の濃度を求めた。

6. 添加法

1) 標準添加法

Sb 及び Ge 標準液を 4%酢酸に添加して、10、15、20、25 及び 30 $\mu\text{g/mL}$ の溶液 (標準液 A~E) を調製した。これらの溶液 100 μL を試験溶液 10 mL に添加し測定溶液 A~E とした (表 3)。各測定溶液を ICP-OES で測定し、添加した濃度 x と各測定溶液から得られた発光強度 y から検量線を作成し、標準添加法により試験溶液中の Sb 及び Ge 濃度を定量した。

表 2 性能評価に用いたブランク溶液及び試験溶液 1~3 の Sb 及び Ge 濃度

元素	濃度 ($\mu\text{g/mL}$) *			
	ブランク溶液	試験溶液 1	試験溶液 2	試験溶液 3
Sb	< 0.005	0.04	0.05	0.06
Ge	< 0.001	0.08	0.10	0.12

* : ブランク溶液の濃度は ICP-MS による実測値 (定量下限値未満)

表3 標準添加法において各測定溶液に添加したSb及びGe濃度

測定溶液	添加した標準液	添加濃度 x (µg/mL) *
測定溶液 A	標準液 A (各 10 µg/mL)	各 0.10
測定溶液 B	標準液 B (各 15 µg/mL)	各 0.15
測定溶液 C	標準液 C (各 20 µg/mL)	各 0.20
測定溶液 D	標準液 D (各 25 µg/mL)	各 0.25
測定溶液 E	標準液 E (各 30 µg/mL)	各 0.30

*: 測定溶液中の濃度として

2) 既知量添加法

Sb、Ge 及び Y 標準液を 4%酢酸に添加して、表 4 に示す濃度の溶液 (標準液 a~c) を調製した。試験溶液及び検量線溶液 (Sb: 0, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10 µg/mL, Ge: 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 µg/mL) に標準液 100 µL を添加し ICP-OES で測定した。絶対検量線法と内標準法により検量線溶液の濃度 x (添加前の濃度) とその発光強度 (または発光強度比) y から検量線を作成し、測定溶液から得られた発光強度 (または発光強度比) により試験溶液中の Sb 及び Ge 濃度を定量した。

7. 代替法の性能評価

1) 性能評価

試験溶液 1~3 を用い、試験溶液中の Sb 及び Ge 濃度を 1 日 2 併行で日を変えて 5 回測定した。各試験溶液の真度、併行精度

(RSD_r %) 及び室内再現精度 (RSD_i %) の性能パラメーターの値は、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁵⁾ に従って、一元配置の分散分析により外れ値を棄

却せずに求めた。各性能パラメーターの目標値はこのガイドラインを参考に、真度は 80~120%、RSD_r は 15%未満、RSD_i は 20%未満とした。また、各定量値が添加濃度の 80~110% の範囲から外れたものを外れ値とした。さらに、既知量添加法の試験溶液 1 及び 3 の結果については、得られた発光強度と規格値濃度の検量線溶液の発光強度を比較して判定を行い、その判定の正誤を確認した。

2) 誤判定発生率の算出

1) 性能評価において得られた発光強度について、試験溶液 1 及び 3 に対する規格値濃度の検量線溶液の発光強度比 (= 試験溶液の発光強度 / 試験溶液と同日に測定した標準溶液の発光強度) を算出した。これらの発光強度比から、一元配置の分散分析により標準偏差 (SD_R: 併行+日間) を求めた。この SD_R と理論上の発光強度比 (理論値: 濃度比) (表 5) を平均値とした正規分布により、試験溶液 1 では発光強度比が 1 より大きい値、試験溶液 3 では 1 より小さい値となる確率を求め、これを誤判定の発生率とした (図 1)⁶⁾。

表4 既知量添加法に用いた標準液 A~C の Sb、Ge 及び Y 濃度と添加した濃度

測定法	添加した標準液	標準液の濃度 (µg/mL)		添加濃度 (µg/mL) *	
		Sb 及び Ge	Y	Sb 及び Ge	Y
既知量添加法 (0.1 µg/mL 添加)	標準液 a	各10	20	各0.1	0.2
既知量添加法 (0.2 µg/mL 添加)	標準液 b	各20	20	各0.2	0.2
既知量添加法 (0.5 µg/mL 添加)	標準液 c	各50	20	各0.5	0.2

*: 測定溶液中の濃度として

表5 既知量添加法における測定時の濃度と理論値上の発光強度比

試験溶液	測定法	元素	試験溶液の 測定時の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準溶液の 測定時の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	理論上の 発光強度比 (理論値)
試験溶液 1 (Sb : 0.04 $\mu\text{g/mL}$) (Ge : 0.08 $\mu\text{g/mL}$)	0.1 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.14	0.15	0.933
	添加	Ge	0.18	0.2	0.900
	0.2 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.24	0.25	0.960
	添加	Ge	0.28	0.3	0.933
	0.5 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.54	0.55	0.982
	添加	Ge	0.58	0.6	0.967
試験溶液 3 (Sb : 0.06 $\mu\text{g/mL}$) (Ge : 0.12 $\mu\text{g/mL}$)	0.1 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.16	0.15	1.067
	添加	Ge	0.22	0.2	1.100
	0.2 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.26	0.25	1.040
	添加	Ge	0.32	0.3	1.067
	0.5 $\mu\text{g/mL}$	Sb	0.56	0.55	1.018
	添加	Ge	0.62	0.6	1.033

発光強度比 (理論値) = 試験溶液測定時の濃度 / 標準溶液の測定時の濃度

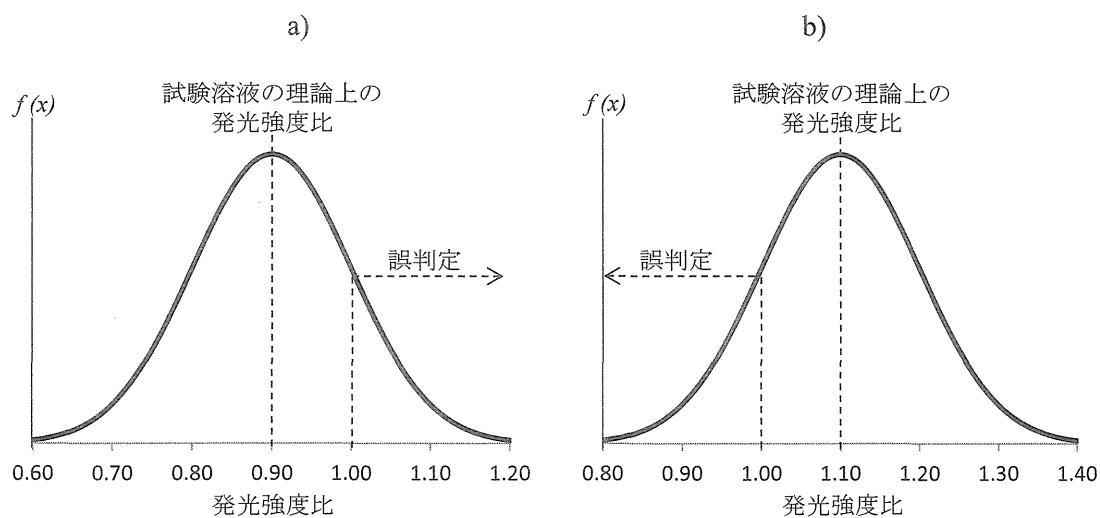


図1 正規分布の一例

- a) 試験溶液の濃度が規格値よりも小さい場合 (例 平均値 : 0.9, 標準偏差 0.1)
- b) 試験溶液の濃度が規格値よりも大きい場合 (例 平均値 : 1.1, 標準偏差 0.1)

C. 研究結果及び考察

1. 濃縮法の検討

1) 蒸発乾固法

平成 25 年度の厚生労働科学研究において、7 または 8 機関で試験溶液 200 mL を蒸発乾固させたのち、4%酢酸 20 mL に再溶解して ICP-OES で測定する方法（蒸発乾固法）により試験を実施したが、半数以上の試験機関では Sb 及び Ge を十分に回収することができなかった³⁾。この原因として、Sb 及び Ge がガラス製容器に吸着したか、乾固時に揮散したためと考えられた。

そこで、標準溶液を、ガラス製結晶皿、ステンレス製、ポリプロピレン (PP) 製、ポリメチルペンテン (PMP) 製、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製及びテトラフルオロエチレン・パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体 (PFA) 製ビーカーに入れ、蒸発乾固法により試験溶液を 20 倍濃縮して回収率を確認した (表 6)。その結果、容器の材質の違いで回収率に若干の差は見られたが、改善はされなかった。このことから Sb 及び Ge は乾固時に揮散した可能性が高いと考えられた。

表 6 蒸発乾固法の容器の材質による Sb 及び Ge の回収率

容器の材質	Sb	Ge
ガラス	89.1 ± 2.9	19.4 ± 1.3
ステンレス	69.6 ± 3.9	21.5 ± 5.4
PP	30.6 ± 3.1	0.4 ± 1.3
PMP	50.3 ± 7.9	21.1 ± 5.2
PTFE	64.4 ± 9.0	12.8 ± 5.9
PFA	47.2 ± 24.1	9.0 ± 2.6

平均値 ± SD (%), n=4 or 5

PP : ポリプロピレン、PMP : ポリメチルペンテン、PTFE : ポリテトラフルオロエチレン、PFA : テトラフルオロエチレン・パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体

次に、試験溶液にアンモニア水を添加して中和し、試験溶液中の Sb 及び Ge の化学形態を変化させ、揮散を抑制させる方法を試みた。その結果、回収率は Sb で約 65%、Ge で約 87% と改善はみられたが、中和により大量の酢酸アンモニウムが生成し、ネブライザーの詰まり、測定波長への干渉等の問題が生じた。

以上から、蒸発乾固法については有用な代替法を確立することはできなかった。

2) キレート法

近年、特定の金属イオンを選択して吸着または除去する用途として、キレート剤を結合させた樹脂や繊維、またはこれらを充填した固相カラムが様々な分野で使用されている。その中には Ge、As、Se、Sn、Sb などの半金属を選択的に吸着するものもある。南澤らはキレート繊維を用いた水道水中の Sb の濃縮法を報告している⁴⁾。そこで、この方法を参考に試験溶液中の Sb 及び Ge を濃縮する方法（キレート法）を検討した。

①測定溶液の調製

標準溶液を用い、南澤らの方法⁴⁾を参考に試験溶液の pH 調整、キレート繊維への吸着時間、吸着した Sb 及び Ge の溶出溶媒について検討し、それぞれの最適な条件を設定した。その結果、まず試験溶液の pH をアンモニアで 7.5~8 に調整したのち、キレート繊維 1 g を加え、30 分間攪拌し、Sb 及び Ge を繊維に吸着させた。フィルターを装着したリザーバーを用いて繊維を採取し、50 mL の PP 製遠心チューブに移した後、10%硝酸・10%酒石酸 (1:1) 混液 20 mL を加えた。10 分間攪拌し、フィルターを装着したリザーバーを用いて Sb 及び Ge を溶出させた。シリンジフィルターでろ過して得られた溶液を測定溶液として Sb 及び Ge を測定し、試験溶液中の濃度を求めた。

試験溶液から測定溶液を調製する一連の操作を 1 時間以内に行うことができ、蒸発濃縮法と比べて試験時間を大幅に短縮できた。

②性能評価

試験溶液 2 を用いて本法の性能評価を行った。内標準として Y を添加後（最終濃度：0.2 µg/mL）、ICP-OES で測定し、絶対検量線法と内標準法の両法で定量した。その定量値、真度、精度を表 7 に示した。Sb の真度は絶対検量線法で 71.8%、内標準法で 83.0%であり、絶対検量線法ではすべての定量値が外れ値に該当し、真度は目標値を満たさなかった。一方、Ge の真度は絶対検量線法で 85.2%、内標準法で 98.4%であり、いずれの定量値も外れ値に該当せず、真度は目標値を満たしていた。一方、RSD_r 及び RSD_i はそれぞれ 0.8~1.3%、1.4~3.9%と良好で目標値を十分満たしていた。

このようにキレート法は蒸発濃縮法と比べて短時間で試験を行うことが可能であり、使用するキレート繊維の量を調整することでより高い倍率で濃縮することも可能である。しかし、Sb の真度が低い、他の試験では使用しないキレート繊維や酒石酸が必要といった欠点があった。

4) 濃縮法の適用性と問題点

Sb 及び Ge の溶出試験法の代替法として、蒸発乾固法の改良を試みたが、Sb や Ge の揮散により回収率が低下し、有用な代替法を確立できなかった。

一方、キレート法は加熱操作を必要としないため、Sb 及び Ge を揮散させずに濃縮することが可能である。さらに濃縮操作に要する時間も 1 時間程度と蒸発濃縮法と比べて短い。しかし、Sb の真度がやや低い、他の試験では使用しないキレート繊維や酒石酸が必要といった欠点がある。

また、これら濃縮法に共通した問題点として、規格試験法では試験溶液をそのまま GF-AAS または ICP-OES に導入して測定するため、試験溶液中の Sb 及び Ge の化学形態（酸化物、塩化物、有機錯体など）に関わらず、試験溶液中に存在するすべての Sb 及び Ge を測定しているが、濃縮法では Sb 及び Ge の化学形態によっては回収できない場合がある。すなわち、蒸発乾固法及び蒸発濃縮法では濃縮時に揮発性が高い化学形態の Sb 及び

表 7 キレート法による定量値、真度及び精度

測定日	Sb 定量値 (µg/mL)		Ge 定量値 (µg/mL)	
	絶対検量線法	内標準法	絶対検量線法	内標準法
1	0.34*, 0.34*	0.41, 0.41	0.84, 0.84	1.00, 1.00
2	0.36*, 0.36*	0.42, 0.43	0.87, 0.87	1.00, 0.97
3	0.36*, 0.36*	0.41, 0.42	0.86, 0.86	0.98, 0.99
4	0.37*, 0.38*	0.43, 0.44	0.86, 0.84	0.99, 0.97
5	0.36*, 0.35*	0.39*, 0.39*	0.84, 0.85	0.97, 0.97
平均値 (µg/mL)	0.36	0.41	0.85	0.98
真度 (%)	71.8	83.0	85.2	98.4
RSD _r (%)	1.0	1.3	0.8	1.3
RSD _i (%)	3.4	3.9	1.4	1.5

RSD_r: 併行精度、RSD_i: 室内再現精度

*: 外れ値 (試験溶液濃度の 80~110%の範囲から外れた定量値)

Geは揮散し、キレート法では有機錯体などの形態のSb及びGeはキレート繊維に保持されない可能性がある。今回は試験溶液として、Sb及びGe標準液から調製した溶液を用いたが、実際の製品の製造業者は製造に使用する触媒などの重合助剤を公表していない。そのため、Sb及びGeがどのような化学形態で製品中に存在しているのか把握できず、試験溶液中の化学形態についても確認できていない。さらに、我が国では合成樹脂製品の製造に用いる物質等に関して、ポジティブリスト制度を採用していないため、重合助剤以外の添加剤等についてもSbまたはGeを含有する化合物の使用の有無を把握できていない。このように、現在の我が国の規制では製品の製造に用いられるSbまたはGe化合物が限定されていないため、試験溶液中に存在するSbまたはGeの化学形態を特定することができず、蒸発濃縮法及びキレート法で回収できない化学形態のSb及びGe化合物が存在する可能性を否定できない。そのため、これらの方法を代替法として使用する場合には、製品の製造に使用された添加剤等についても注意する必要がある。

2. 添加法の検討

1) 測定条件の検討

規格試験法は、Sb及びGeの化学形態に関わらず、試験溶液中に存在するすべてのSb及びGeを対象とした試験であるため、代替法は、公定法と同様に試験溶液をそのまま測定する方法が望ましい。大部分の試験機関におけるICP-OESのSb及びGeの定量下限値は、規格値に近い値であったことから(表1)、測定条件や定量法を変更することで対応が可能となるのではないかと考えた。

検討に用いる測定波長として、Geは最も発光強度が高く、ピーク形状も良好である265.118 nmを選択した。Sbについては、主な測定波長は206.833と217.581 nmであり、平成25年度の試験室間共同試験³⁾でも12機関中8機関が206.833 nm、4機関が217.581 nmを使用していた。これらの発光強度は同程度であったが、206.833 nmでは近傍に高いピークが存在したため、217.581 nmを選択した。今回用いた装置における0~0.6 µg/mLのSb(217.581 nm)及びGe(265.118 nm)のスペクトルを図2に示した。Sb及びGeは発光強度が比較的弱く、最も発光強度が高い測定波

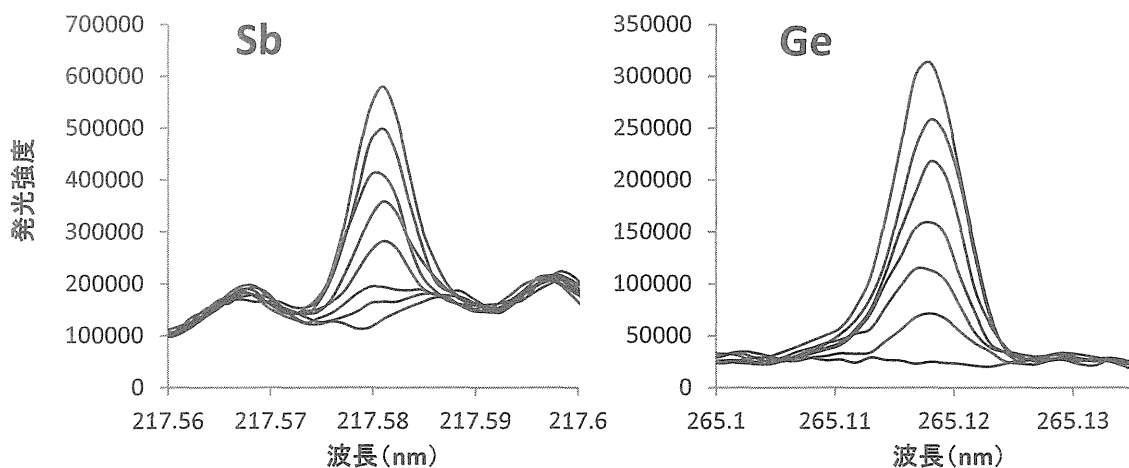


図2 ICP-OESにおけるSb(217.581 nm)及びGe(265.118 nm)のスペクトル

Sb濃度 : 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/mL Ge濃度 : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/mL

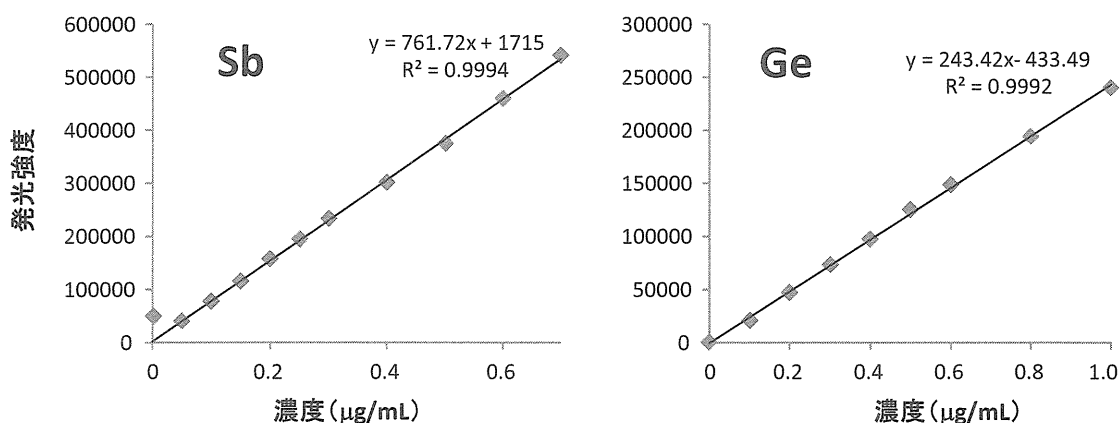


図3 ICP-OESによるSb及びGeの検量線

長においても標準溶液では、かろうじてピークと認識できる程度であった。また、Sb (217.581 nm) については、規格値のSbよりも大きいピークが両側に存在するため、バックグラウンド (BG) 補正のための測定波長の設定を慎重に行う必要があると考えられた。

選択した測定波長を用いて得られた発光強度からそれぞれの検量線を作成した。ただし、今回はピークサーチモード (PSM) で測定したため、0 µg/mL のSbでは、217.581 nmの発光強度ではなく、妨害ピークの発光強度を測定していた。そのため、Sbについては0 µg/mLの点を外して検量線を作成した。いずれの検量線も規格値付近の濃度から規格値の5倍程度の濃度まで広範囲で良好な直線性を有していた (図3)。さらに、これらの検量線は原点の近くを通ることから、BG補正は適切に行われていると判断された。

このように ICP-OES では広範囲の濃度で良好な直線性を有する検量線が得られることから、既知量のSb及びGeを試験溶液に添加して定量し、試験溶液中の濃度を求める方法 (添加法) を用いれば、公定法と同様に試験溶液中に存在するすべてのSb及びGeを測定することが可能と考えた。そこで、添加法として標準添加法、並びに試験溶液及び検量線溶液に一定量のSb及びGeを添加して測定する方法 (既知量添加法) について検証を行い、

代替法としての適用性を確認した。

2) 標準添加法

標準添加法は、試験溶液に濃度の異なる測定対象物を添加して調製した測定溶液を測定し、測定対象物の添加濃度と各測定溶液から得られた発光強度により検量線を作成し、その検量線の切片と傾きから元の試験溶液の濃度を求める定量法である。そのため、定量下限値以上の濃度となるように測定対象物を添加すれば、絶対検量線法で定量下限値未満の試験溶液を定量することが可能である。また、標準添加法ではすべての測定溶液が同じマトリックスの溶液となるため、得られた定量値については共存物質によるマトリックス効果を考慮する必要がない。そこで、PET製使い捨てカップを試料として得られた溶出液にSb及びGeを各濃度で添加した試験溶液1~3を用いて標準添加法の性能を評価した。

Sb及びGeの検量線の一例を図4、各試験溶液の真度、 RSD_r 、 RSD_i 等を表8に示した。Sbの真度は102.5~105.0%、 RSD_r は2.9~6.5%、 RSD_i は5.0~7.4%、Geの真度は94.1~99.6%、 RSD_r は2.3~7.4%、 RSD_i は3.9~9.5%であり、いずれも目標値を満たしていた。また、試験溶液1及び3については誤判定となる結果は存在せず、いずれも正しく適否判定を行うことができた。

一方、外れ値がSbでは4つ、Geでは1つ

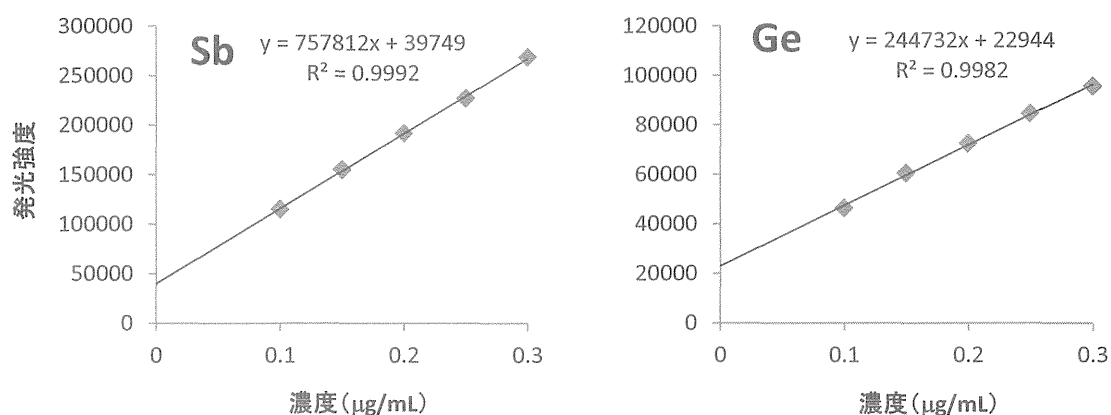


図4 標準添加法による試験溶液2のSb及びGeの検量線

表8 標準添加法における定量値、真度、精度

測定日	Sb 定量値 (µg/mL)			Ge 定量値 (µg/mL)		
	試験 溶液 1	試験 溶液 2	試験 溶液 3	試験 溶液 1	試験 溶液 2	試験 溶液 3
1	0.046 ^{*1}	0.051	0.062	0.084	0.092	0.116
	0.043	0.054	0.059	0.078	0.098	0.118
2	0.044	0.049	0.068 ^{*1}	0.086	0.098	0.112
	0.045 ^{*1}	0.052	0.065	0.070	0.085	0.106
3	0.043	0.053	0.056	0.078	0.094	0.115
	0.045 ^{*1}	0.053	0.063	0.080	0.095	0.115
4	0.037	0.053	0.064	0.069	0.093	0.132
	0.039	0.055	0.062	0.069	0.096	0.138 ^{*1}
5	0.039	0.050	0.064	0.088	0.098	0.121
	0.040	0.047	0.055	0.084	0.092	0.122
平均値 (µg/mL)	0.042	0.052	0.062	0.079	0.094	0.120
真度 (%)	105.0	103.3	102.5	98.3	94.1	99.6
RSD _r (%)	2.9	3.8	6.5	7.4	5.2	2.3
RSD _i (%)	7.4	5.0	6.9	9.5	3.9	8.5
外れ値数 ^{*1}	3	0	1	0	0	1
誤判定数 ^{*2}	0	—	0	0	—	0

RSD_r: 併行精度、RSD_i: 室内再現精度

*1: 外れ値 (試験溶液濃度の80~110%の範囲から外れた定量値)

*2: 誤判定 (試験溶液1: 規格値濃度より高い、試験溶液3: 規格値濃度より低い) となる結果

存在した。これらはいずれも添加量に対して110%を超えたためであった。標準添加法を用いて定量するには、通常の検量線溶液により作成した検量線が原点を通る直線でなければならない。そのため、正確なBG補正が求められるが、Sbでは測定波長の近傍にピークが存在するため正確に補正することが困難であり、定量値が真値よりも数ng/mL程度ずれることがある。また、この方法では元の試験溶液濃度が定量下限値未満となるため、 $x=0$ の点を検量線に含めることができず、検量線の低濃度側の信頼性がやや低くなる。これらの理由から、Sbでは正確な定量値が得られない場合がある。

以上から、標準添加法は代替法として十分な性能を有していた。しかし、Sb及びGeのピーク形状、測定波長付近の妨害ピークの有無、BG値の安定性などにより適切なBG補正ができない場合は正確な定量値が得られないことがある。

3) 既知量添加法

既知量添加法は、試験溶液に一定量の測定対象物を添加して調製した測定溶液を測定し、検量線溶液の濃度と発光強度から作成した検量線を用いて測定溶液の定量を行った後、その定量値から添加した濃度を差し引いて試験溶液の濃度を求める定量法である。そのため、

絶対検量線法で定量下限値未満であった試験溶液についても、定量下限値以上の測定対象物を試験溶液に添加すれば、定量可能となる。公定法では標準溶液と試験溶液の発光強度の比較により適否判定を行うため、今回は公定法の代替法として標準溶液にも試験溶液と同じ量のSb及びGeを添加し、それぞれの発光強度を比較して適否判定を行う方法として検討した。そのため、試験溶液の定量を行う場合は、検量線溶液に試験溶液と同じ量のSb及びGeを添加し、添加前の検量線溶液の濃度を x 、その発光強度（または発光強度比）を y として検量線を作成し、測定溶液の発光強度から直接試験溶液の濃度を求めることとした。

①性能評価

試験溶液1~3を用いて既知量添加法の性能を評価した。検量線溶液及び試験溶液に添加する濃度は各試験機関の定量下限値を考慮し、0.1、0.2及び0.5 $\mu\text{g/mL}$ の3濃度で行った。以下、それぞれを既知量添加法(0.1 $\mu\text{g/mL}$ 添加)、既知量添加法(0.2 $\mu\text{g/mL}$ 添加)及び既知量添加法(0.5 $\mu\text{g/mL}$ 添加)とした。また、定量は絶対検量線法と内標準法の両法で行った。Sb及びGeの検量線の一例を図5、各添加濃度におけるそれぞれの試験溶液の真度、 RSD_r 、 RSD_i 等を表9~11に示した。

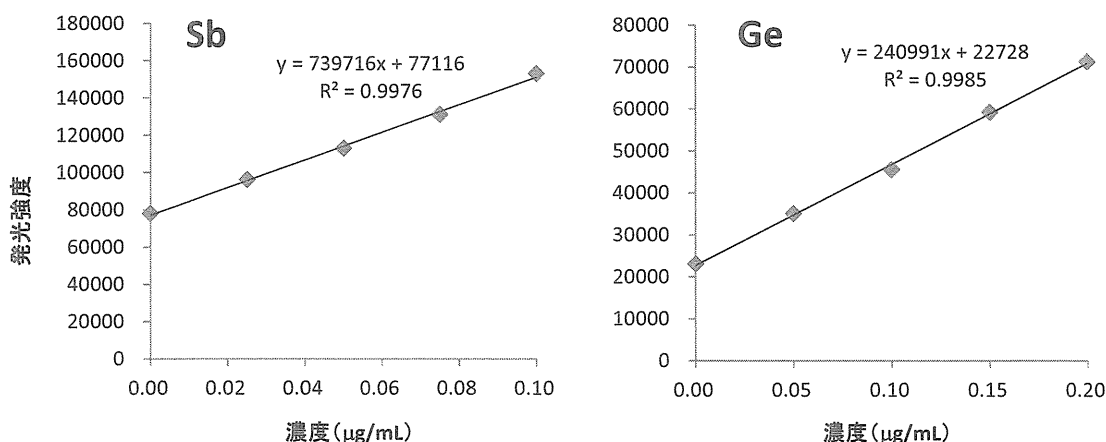


図5 既知量添加法(0.1 $\mu\text{g/mL}$ 添加)におけるSb及びGeの検量線