

<その3> カプロラクタム試験におけるピーク形状改善のためのGC条件の検討

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	阿部 智之	(公社)日本食品衛生協会
研究協力者	大野 浩之	名古屋市衛生研究所

A. 研究目的

食品衛生法では、ナイロンを主成分とする合成樹脂製の器具・容器包装についてカプロラクタム(CPL)の溶出試験が規定され、その溶出量は15 µg/mLに規制されている。本試験は、20%エタノールを浸出用液とした60分間の溶出条件により試験溶液を調製し、定性試験および定量試験を行う。定性試験では、試験溶液およびCPL標準溶液(15 µg/mL)をガスクロマトグラフ・水素炎イオン化検出器(GC-FID)により測定し、CPLのピーク検出時間を比較し、一致した場合に定量試験を行うこととなっている。定量試験では試験溶液とCPL標準溶液のCPLピーク面積を比較して適否判定を行うこととされている。

平成26年度の厚生労働科学研究において、器具・容器包装等の規格試験法の性能評価の一つとして、CPL試験の定量精度について試験室間共同試験を行った結果、各性能パラメータの値は極めて良好で、規格試験法として十分な性能を有していることが判明した¹⁾。同様に、内標準物質としてヘプタラクタム(HPL)を用いた内標準法についても公定法である絶対検量線法と同等以上の性能を有していることが明らかとなった。しかし、一部の機関から、CPLのピーク割れが発生すると報告があった。

CPL試験では試験溶液と標準溶液のピーク面積を比較して適否判定を行うため、ピーク割れが発生した場合は、正確なピーク面積が算出できず、誤った判定を行う可能性がある。そこで、CPLのピーク割れ改善のためGC条

件を種々検討し、ピーク割れ発生時の対応策についても検討した。

B. 研究方法

1. 試薬等

CPL: -カプロラクタム(>99.0%) HPL: -ヘプタラクタム(>99.0%) 以上東京化成工業製

エタノール:残留農薬・PCB試験用(99.5%)
メタノール:残留農薬・PCB試験用(メタノール5000) 以上和光純薬工業製

CPL、HPL混合標準原液:CPLおよびHPL各20 mgに20%エタノールを加えて20 mLに定容した(1,000 µg/mL)

CPL、HPL混合標準溶液:CPL、HPL混合標準溶液3 mLに20%エタノールを加えて20 mLに定容した(150 µg/mL)

試験溶液:CPL、HPL混合標準溶液10 mLに20%エタノールを加え100 mLに定容した(15 µg/mL)。試験溶液は冷蔵庫(4℃)で保存し、室温に戻してから使用した。

2. 装置

GC-FID: 6890N、オートインジェクター: 7863B Series、以上 Agilent Technologies 社製

3. 測定条件

特に記載している場合を除き GC-FID の測定条件は公定法にしたがった。詳細を以下に示す。

カラム: DB-1 (30 m×0.32 mm, 5 µm, Agilent Technologies 社製) オープン温度: 240 (15

分) キャリヤーガス: He、キャリヤーガス流量: CPL の保持時間が約 5 分となるように適宜調節した、ライナー: スプリット用 (シングルテーパー、ウール入り、PN 5183-4647、Agilent Technologies 社製) 注入量: 1 μ L、シリンジ容量: 10 μ L、シリンジ洗浄溶媒 (注入前および注入後) および回数: 20%エタノールおよびメタノール、各 3 回、シリンジ共洗い回数: 3 回、スプリット比: 10 : 1、注入口温度: 240、検出器温度: 240、 H_2 ガス流量: 30 mL/min、空気流量: 400 mL/min、メイクアップガスおよび流量: N_2 、24.6 mL/min

4. 気化容量の計算

気化容量の計算には圧力・流量計算ツールおよび気化容量計算ツール (GC Calculator, <http://www.chem.agilent.com/en-US/Technical-Support/Instruments-Systems/Gas-Chromatography/utilities/Pages/GCCalculators.aspx> より入手) を用いた。

圧力・流量計算ツールにカラムサイズ、注入口温度、流速等を入力し、注入口圧力を求めた。その後、気化容量計算ツールに溶媒の種類、注入口ライナーの種類、注入量、流入量温度および算出した注入口圧力を入力し、推定気化容量を求めた。なお 20%エタノールは溶媒の選択肢になかったため、水 0.8 μ L とエタノール 0.2 μ L の推定気化容量をそれぞれ算出し、得られた数値を合算した値を 20%エタノールの推定気化容量とした。(気化容量計算ツールには初期設定でエタノールは選択できなかったため溶媒のプロパティにエタノールを追加した。追加方法は <参考> に示した。)

C. 研究結果および考察

1. ピーク割れの発生頻度の確認

CPL と HPL (内標準) を 15 μ g/mL (規格値) 含有する 20%エタノール溶液を試験溶液とし、この試験溶液を公定法の GC 条件で 1 日 20

回ずつ日を変えて複数回測定し、CPL および HPL のピーク形状およびピーク割れが発生する頻度を確認した。ただしシリンジを介したコンタミを防止するため、試験溶液は同一のバイアルからは採取せず、20 個のバイアルを用意しそれぞれから採取して注入した。

その結果、ピーク形状がシャープで良好なピークも検出されたが、図 1 に示すようにショルダーやサブピークを有するピーク割れが確認された (表 1)。サブピークの大きさは一定ではなく、ピーク強度比がおよそ 1 : 2 の大きなピーク割れ、ピーク強度比がおよそ 1 : 5 の小さなピーク割れ、ピーク強度比が 1 : 10 以下の非常に小さなピーク割れが確認された。さらに、ピークは分離していなかったが フロンティングが発生しているピークも確認された。また、ピーク割れの頻度は測定日毎に異なり、ほとんど発生しない日、

や のようなピーク割れが 4, 5 回程度発生する日、すべて のようなピーク割れが発生する日など様々であった。また、連続性や再現性等の規則性もなく、ピーク割れが発生するタイミングも日によって異なっていた。

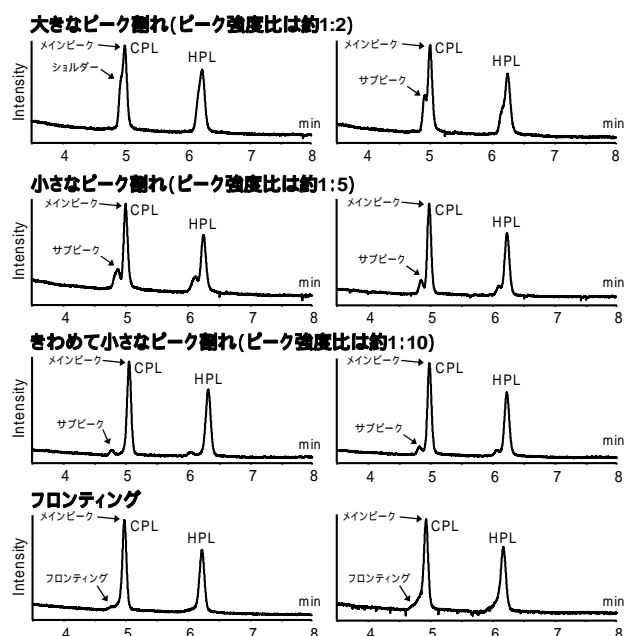


図 1 CPL のピーク割れの例
CPL: カプロラクタム, HPL: ヘプタラクタム

表1 公定法におけるCPLおよびHPLのピーク形状、面積値および面積比の比較

No.	ピーク形状*	面積値				面積比 (Cap/Hep)	
		CPL		HPL		メインピーク	合算
		メインピーク	合算	メインピーク	合算		
1	良好	15.295	-**	13.068	-**	1.17	-**
2		13.779	16.490	11.020	13.234	1.25	1.25
3		10.238	13.490	7.881	10.766	1.30	1.25
4		10.703	15.218	8.966	12.961	1.19	1.17
5		13.314	15.843	10.749	13.167	1.24	1.20
6		13.061	15.374	10.442	13.326	1.25	1.15
7		15.547	-**	12.860	-**	1.21	-**
8		12.456	15.784	10.552	13.405	1.18	1.18
9		10.566	17.029	8.454	14.210	1.25	1.20
10		14.419	-**	11.993	-**	1.20	-**
11		11.402	14.110	9.392	11.988	1.21	1.18
12		11.803	15.114	9.631	12.522	1.23	1.21
13	良好	15.113	-**	13.183	-**	1.15	-**
14		11.174	15.201	9.181	12.403	1.22	1.23
15	良好	15.135	-**	13.052	-**	1.16	-**
16		14.572	-**	12.148	-**	1.20	-**
17		14.598	-**	12.716	-**	1.15	-**
18		12.727	15.292	10.322	12.356	1.23	1.24
19	良好	14.590	-**	11.921	-**	1.22	-**
20		13.019	15.503	11.099	13.181	1.17	1.18

20% EtOH		-	-	-	-	-	-

Ave		13.176	15.186	10.931	12.723	1.21	1.19
SD		1.73	0.79	1.65	0.74	0.04	0.03
RSD		13.1	5.2	15.1	5.8	3.2	2.7

* 大きなピーク割れ, 小さなピーク割れ, きわめて小さなピーク割れ, フロンティング

**ピーク割れがなかった場合はメインピークを計算に用いた

2. ピーク割れが発生する原因の推定

ピーク割れが発生する原因を推定するため、はじめに、サブピークがキャリーオーバーにともなうメモリー現象によるものなのかを確認した。試験溶液を20回測定した後にブランクとして20%エタノールを測定したがCPLおよびHPLのピークは検出されなかった(表1)。したがってサブピークはメモリー現象に由来するものではないと考えられた。

次に、CPLおよびHPLについて、メインピークだけの場合と、メインピークとサブピークを合算した場合の面積値を比較した。表1

にそれぞれの場合の面積値の平均値、標準偏差(SD)および相対標準偏差(RSD)を示した。メインピークだけの場合のCPLとHPLの面積値のRSDは13.1および15.1%であったのに対し、合算した場合は5.2および5.8%と半分以下になった。このように面積値を合算した場合にはRSDが明らかに小さかったことから、サブピークはメインピーク同様CPL由来であると考えられた。また、CPLのピーク割れが生じた場合は必ずHPLのピークも同様の形状をしていたことから、CPLとHPLの面積比についてもメインピークだけ

の場合と、メインピークとサブピークを合算した場合で比較した。その結果、いずれの場合も RSD は 3%程度となり面積比の差はほとんどなかった。つまり CPL と HPL は全く同じ挙動を示し、メインピークとサブピークの割合も同等であった。このことから、ピーク割れは GC の物理的な要因に起因するものであり、とりわけ試験溶液の注入時に何らかの問題が生じている可能性があるかと推測された。

公定法では 20%エタノールの試験溶液を GC に 1 μL 注入するが、この試験溶液の約 80%は水である。水の気化膨張率は大きいいため、注入時のカラムへの導入量が不安定な状態となっているのではないかと考えられた。そこで、20%エタノールを 1 μL 注入したときの推定気化容量を求めた。

圧力・流量計算ツールにより公定法のカラム条件における注入口圧力を求めたところ、94.71 kPa であった(図 2-1)。次に、気化容量計算ツールにより推定気化容量を求めた結果、水 0.8 μL では 963 μL 、エタノール 0.2 μL では 74 μL となり、20%エタノールの気化容量は両者を合算して 1,037 μL と推定された(図 2-2)。一方、ライナー容量は 850 μL であることから、約 20%オーバーロードしていることが明らかとなった。したがって、試料のオーバーロードがピーク割れの原因であると疑われた。



図2-1 公定法のカラム条件における注入口圧力の計算

3. カラムサイズの変更

一般に、試料のオーバーロードは気化容量を小さくすることで抑制される。気化容量を小さくするためには、現行のカラムよりも長く、カラム内径が小さいものを選択する必要がある。そこで、カラム長さを 30 から 60 m、カラム内径を 0.32 から 0.25 mm に変更したときのピーク形状を確認した。ただし、膜厚は市販品で最も厚い 1 μm とし、キャリアガスの流量は公定法における平均線速度と同じになるように 1.7 mL/min とした。なおこのときの CPL は約 4.8 分に流出した。また、推定気化容量は 466 μL となりライナー容量は超えなかった。

試験溶液を繰り返し 20 回測定したときの CPL のピーク形状を表 2 にまとめ、代表的なクロマトグラムを図 3 に示した。その結果、図 1 のような大きなピーク割れは確認されなかったが、もしくは のような小さなピーク割れが大部分で確認され、一部は 3 本に分かれた。このようにカラムサイズを変更することで若干のピーク形状の改善は認められた。しかしピーク割れを完全に改善することはできずその原因は不明であった。



図2 2 公定法のカラム条件における推定気化容量上:水 0.8 μL 、下:エタノール 0.2 μL

表2 各測定条件変更によるCPLのピーク形状のまとめ

ピーク形状	公定法	カラム サイズの 変更	水の注入量の低減									
			0.5 μ L 注入	0.5 μ L注入					有機溶媒による希釈(1 μ L注入)			
				スプリット比 変更	注入口温度 変更	昇温条件の 変更	ライナーの 変更	ウール量 変更	エタノール	アセトン	注入口温度 280	
											エタノール	アセトン
良好	4	0	8	5	12	20	7	20	11	15	20	20
	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
	3	2	1	15	0	0	4	0	0	0	0	0
	9	18	11	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	8	0	4	0	9	5	0	0
ベースラインの乱れ	0	0	0	5	1	0	0	8	1	2	6	6
CPL面積値のRSD ^{*1}	5.2	6.1	4.2	3.6	2.7	3.9	2.4	1.6	1.5	1.7	1.8	2.3
HPL面積値のRSD ^{*1}	5.8	6.4	5.2	4.9	2.4	3.2	1.8	2.1	1.9	2.2	1.5	3.1
CPL/HPL面積比のRSD ^{*1}	2.7	3.4	4.1	2.4	2.5	4.9	2.7	2.6	1.5	1.8	2.0	2.1

数値は試験溶液を20回測定したときの各ピーク形状のピークおよびベースラインの乱れが発生したときの回数を示した。

ピーク形状は図1に示した 大きなピーク割れ, 小さなピーク割れ, きわめて小さなピーク割れ, フロンティングに分類した。

*1ピークが分離した場合の面積値および面積比は合算した数値を用いた

各測定条件における変更内容は以下のとおり

カラムサイズ変更:長さ30 m, 内径0.32 mm, 膜厚5 μ m (公定法) 長さ60 m, 内径0.25 mm, 膜厚1 μ m

0.5 μ L注入:5 μ L容シリンジを使用

スプリット比変更:10:1 (公定法) 20:1

注入口温度変更:240 (公定法) 280

昇温条件の変更:240 (15分)(公定法) 150 -10 /分-280

ライナーの変更:スプリット分析用テーパ付きライナー スプリット用ストレートライナー

ウール量変更:図6に示すように, およそ倍量になるようにライナーのウールを追加した

有機溶媒による希釈:エタノールもしくはアセトンで試験溶液を倍に希釈した

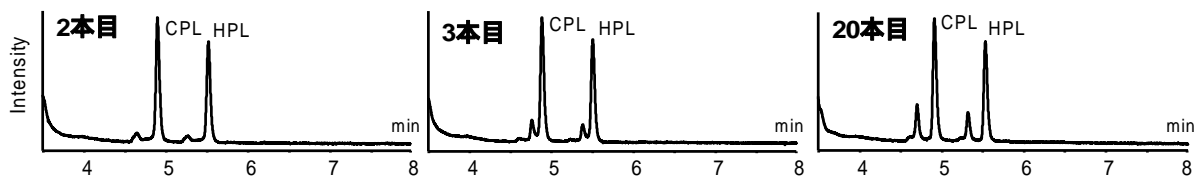


図3 カラムサイズを変更したときの試験溶液のクロマトグラム
CPL: カプロラクタム, HPL: ヘブタラクタム

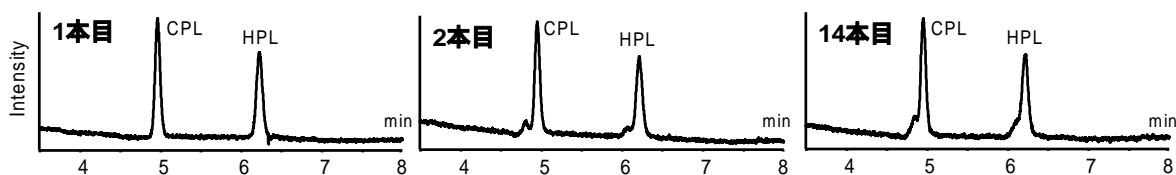


図4 注入量を 0.5 μL としたときの試験溶液のクロマトグラム
CPL: カプロラクタム, HPL: ヘブタラクタム

4. 水の注入量の低減

試料のオーバーロードは試験溶液中の水が主な原因であり、水の注入量を減らすことで解消されると期待された。そこで水の注入量を低減させたときのピーク形状を確認した。

1) 注入量の変更

水の注入量を減らすことはすなわち試験溶液そのものの注入量を減らすことでもある。そこで試験溶液の注入量を低減したときのピーク形状を確認した。

本研究で使用したオートインジェクターでは、使用するシリンジ容量の 2、10、20、30、40 および 50% に相当する量の注入が可能である。通常使用されるシリンジ容量は 5 または 10 μL であることから、1 μL 未満で可能な注入量は 10 μL 容のシリンジを用いた 0.2 μL と 5 μL 容のシリンジを用いた 0.5 および 0.1 μL である。このうち、0.1 μL では注入量が少なすぎて十分な感度を得られないことが予想されたため、0.2 および 0.5 μL について検討した。各注入量における 20% エタノールの推定気化容量は 0.2 μL では 206 μL 、0.5 μL では 518 μL であるため、いずれもライナー容量より小さくなり、ピーク割れの解消が期待される。試験溶液を注入量 0.2 および 0.5 μL で 20 回繰り返し測定し、CPL と HPL の各ピーク面積値およびその面積比を算出し、10 μL 容の

表3 注入量の違いによる面積値および面積比のRSD (%) の比較

注入量	面積値		面積比
	CPL	HPL	CPL/HPL
1	5.2	5.8	2.7
0.5	4.2	5.2	4.1
0.2	7.6	8.8	4.4

ピークが分離した場合の面積値および面積比は合算した数値を用いた

シリンジを用いた 1 μL 注入の結果(表1のデータを使用)と比較した。

表3にそれぞれの注入量で試験溶液を 20 回測定したときの面積値および面積比の RSD (%) を示した。ただし、ピーク割れが生じた場合は合算した値を用いた。面積比の RSD は注入量に関わらず、いずれも 5% 未満と良好であったが、面積値の RSD は 1 および 0.5 μL 注入では 4.2 ~ 5.8% であったのに対し、0.2 μL 注入では 7.6 および 8.8% とわずかに大きかった。以上の結果から、注入量を減らしつつ公定法の 1 μL 注入と同程度の精度を得るためには 5 μL のシリンジを用いて 0.5 μL 注入とするのが適切と考えられた。

この時の CPL のピーク形状を表2にまとめ、代表的なクロマトグラムを図4に示した。図1のような大きなピーク割れは発生しなかったが、およびのような小さなピーク

割れがおよそ半数から確認された。

このように、注入量を公定法の半分の 0.5 μL にすることでピーク形状の改善が認められたがピーク割れを完全になくすことはできなかった。

2) その他条件の変更

注入量を 0.5 μL に変更しても完全にピーク割れは改善されなかったが、カラムサイズを変更したときよりも大幅な改善が認められた。したがって注入量を 0.5 μL としたうえで、さらに種々の条件を変更することでピーク形状のさらなる改善が期待された。そこで、スプ

リット比、注入口温度、カラム昇温条件、ライナーのグラスウール量およびライナーの種類といった条件を変更することでピーク形状が改善されるか否かを確認した。それぞれの条件におけるピーク形状を表 2、代表的なクロマトグラムを図 5 に示した。

スプリット比

スプリット比を 10:1 から 20:1 に変更し、試験溶液を 20 回測定した。その結果、半数以上で極めて小さなピーク割れが確認された。また 50:1 に変更しても改善は認められなかった。そのため、スプリット比の変更ではピーク割れの改善は見られなかった(図 5)。

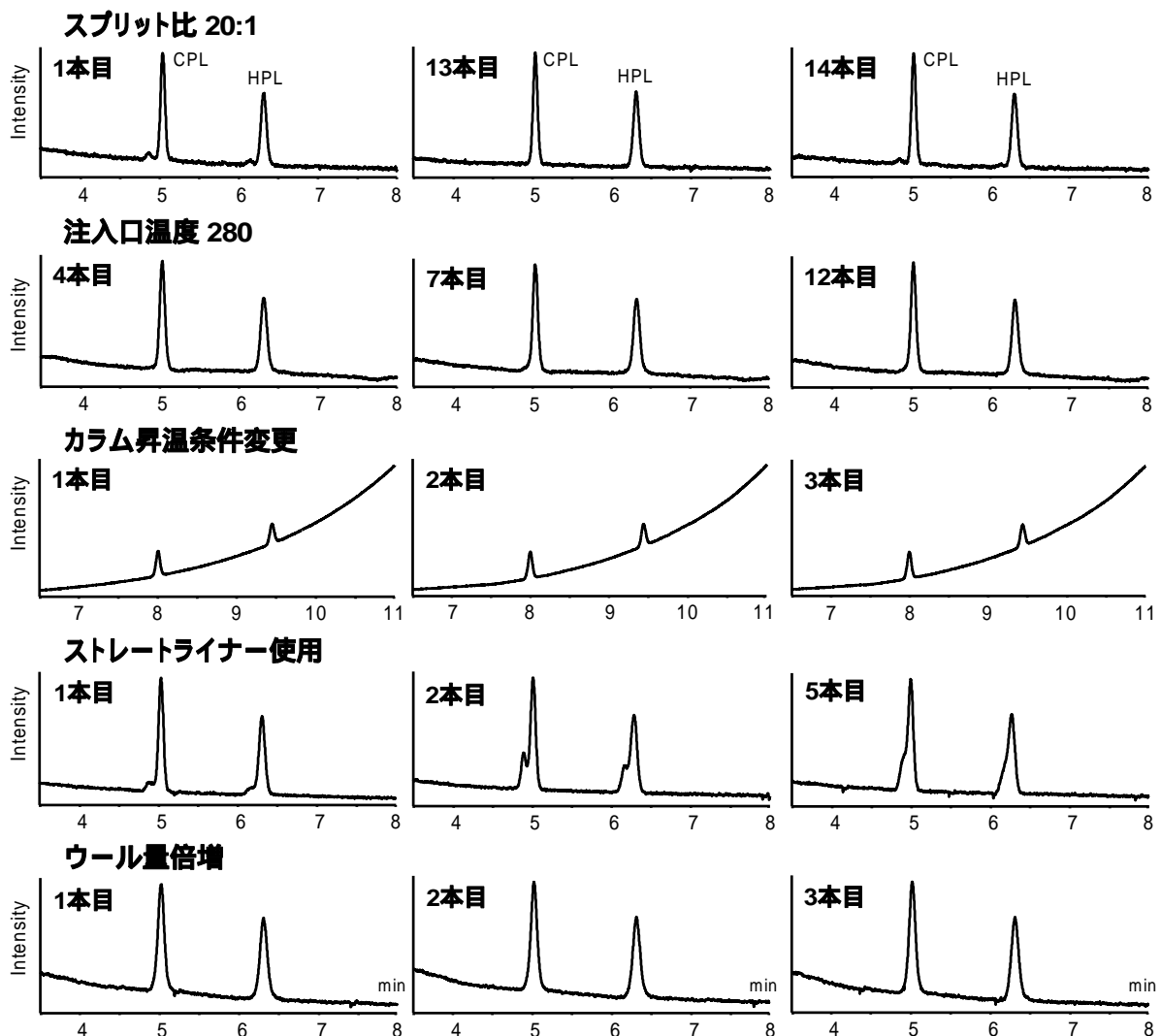


図 5 注入量およびスプリット比などのその他条件を変更したときの試験溶液のクロマトグラム
CPL: カプロラクタム, HPL: ヘブタラクタム

注入口温度

注入口の温度をカラム温度より高くすることで、試料がカラムに注入された際のコールドトラップ効果により、ピーク形状が改善する可能性があった。そこで注入口温度を240 からカラムの最高温度である280 に変更し、ピーク形状を確認した。その結果、ピーク割れは確認されなかったが、ピークのわずかなフロンティングが約半数で確認された(図5)。

カラム昇温条件

カラム初期温度を低くすることでコールドトラップ効果が得られピーク形状が改善されると期待された。そこでカラムの初期温度を下げ、昇温条件を150 -10 /min-280 としたときのピーク形状を確認した。その結果、ピーク割れはほとんど発生しなかったが、ベースラインが著しく上昇し、試験法としては望ましくなかった(図5)。初期温度、昇温条件、最終温度などを変更したが、いずれもベースラインの上昇は改善できず、適切な温度条件を設定できなかった。

ライナーの種類

ライナーの形状はメーカーにより様々であるが、基本的にストレートライナーとテーパー付きライナーの2種に大別される。ストレートライナーはテーパー付きライナーよりも容量が大きく、スプリット比が大きい分析に適している。そこで、スプリット用の不活性処理済みストレートライナー(ウール入り、PN 5190-2294)に変更し、ピーク形状を確認した。しかし、ほとんどの場合で図1 および のようなピーク割れや のようなピークのフロンティングが確認され、ピーク割れは改善しなかった(図5)。

ライナー中のウール量

ライナー中のウール量の違いによるピーク形状への影響を確認した。図6に示すように、不活性化したガラスウールを通常のほぼ半分量および倍量詰めたライナーを用いて試験溶

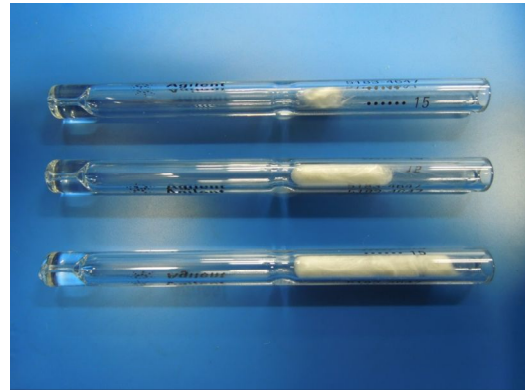


図6 ウール量を変更したライナー
上段:約半分,中段:通常,下段:約2倍

液を測定した。

ガラスウール量を半分にした場合、ベースラインが大きく波打つように乱れたため、ピーク面積の正確な算出は困難であった。この原因は、シリンジの先端がウールに届いていないため、試料の気化が不十分となってしまったためと考えられた。

一方、ガラスウールを倍量にした場合、ベースラインにノイズピークが見られたが、ピーク割れおよびフロンティングは確認されなかった(図5)。

3) 試験溶液の希釈

有機溶媒の気化容量は水よりも小さく、公定法の測定条件における推定気化容量は、メタノールが約540 μL 、アセトニトリルが約410 μL 、エタノールが約370 μL 、アセトンが約300 μL 、イソプロパノールが約280 μL 、テトラヒドロフランが約270 μL 、ヘキサンが約160 μL と水の半分以下となる。したがって、試験溶液を有機溶媒で希釈することにより水の注入量を減らすことができると考えられた。そこで、試験溶液に有機溶媒を加えて2倍希釈したものをを用いて、公定法の条件で測定しピーク形状を確認した。希釈に用いる有機溶媒は水やCPLとの相溶性および気化容量を考慮し、エタノールおよびアセトンとした。希釈にエタノールを用いたときの推定気化容量は約700 μL 、アセトンを用いたときは約

670 μL となり、いずれの場合もスプリット用テーパー付ライナーの容量 (850 μL) を超えなかった。

希釈した試験溶液を 20 回測定したときの CPL のピーク形状を表 2、代表的なクロマトグラムを図 7 に示した。いずれの溶媒で希釈した場合もピーク割れは発生せず、CPL および HPL の面積値およびこれらの面積比の RSD も約 2% と良好であった。しかし全体的にわずかではあるがフロンティングが確認された (図 7、)。そこでコールドトラップ効果を得るために注入口温度を 280 に変更して測定したところ、いずれの溶媒で希釈した場合も一部にベースラインの乱れが発生したが、ピーク形状はシャープでフロンティングは発生しなかった (図 7、)。

4) ピーク形状改善のまとめ

オーバーロードによるピーク割れは、水の注入量を少なくし、注入口温度を高くするもしくはライナーのガラスウールを増量することで改善された。このうち注入量の低減については、本研究のように 5 μL のシリンジを用いても良いが、使用するオートインジェクターによっては 10 μL のシリンジでも 0.5 μL 注入が可能である。また、試験溶液を有機溶媒で希釈することも有効であった。これらの変更は簡単であり、いずれの機関においても容易に適用可能である。一方、ガラスウールを追加する作業は若干煩雑であり、新たなコンタミの要因にもなりうるので注意が必要であった。

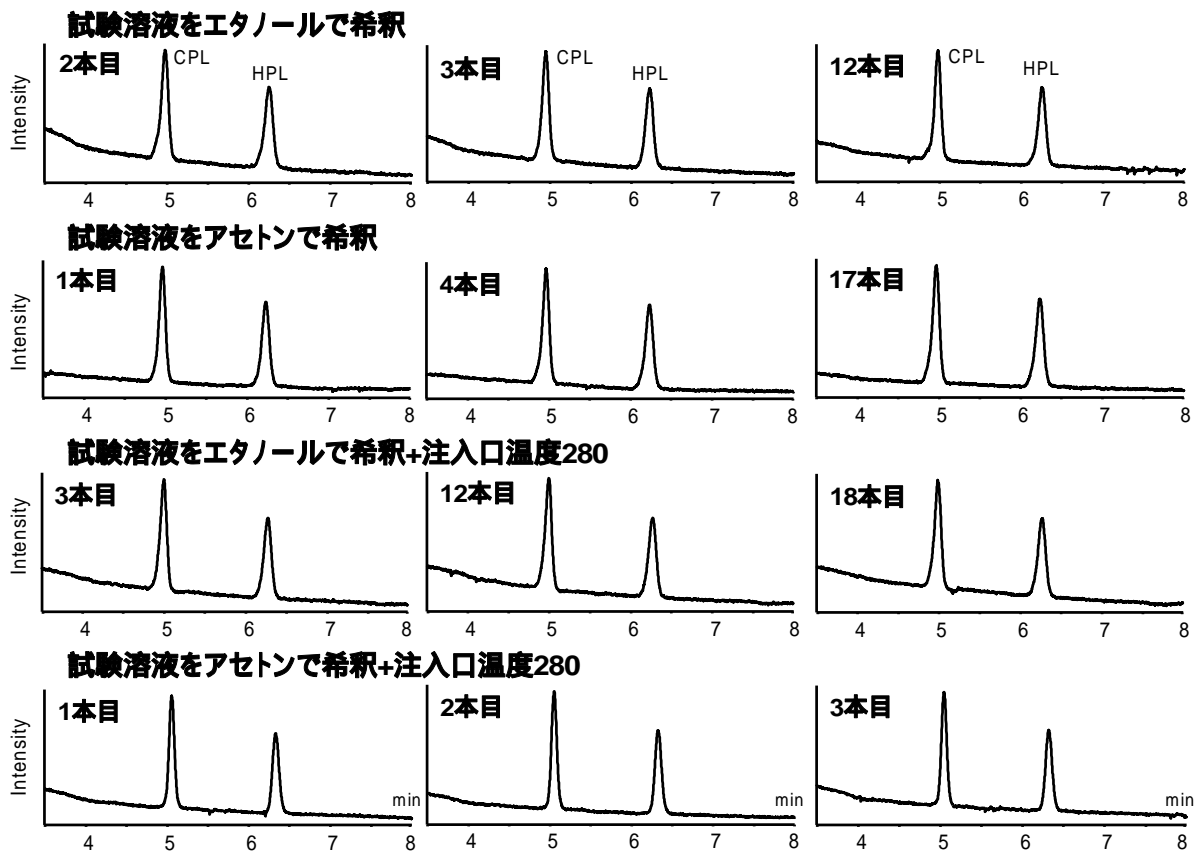


図7 試験溶液を有機溶媒で希釈したときのクロマトグラム
CPL: カプロラクタム, HPL: ヘブタラクタム

5 . ピーク割れ発生時の対応

CPLのピーク割れは試験溶液の約80%を占める水の気化膨張率が大きいために発生すると考えられたが、発生する頻度やタイミングに規則性や再現性はなく、ピーク形状も様々であった。実際の試料において、例えば図1～のような2つのピークが存在した場合、サブピークがCPLのピークの一部なのかCPL以外の溶出物または混入物なのか判断することはできない。そのため、CPLのピーク割れが疑われる場合は、試験溶液にHPLを添加し、CPLとHPLのピーク形状を比較することで、サブピークがCPLのピークの一部なのかCPL以外の物質によるものなのかの判断の目安になると考えられた。

ピーク割れが頻発する場合は、コールドトラップ効果を得るために注入口温度を高く設定したり、試験溶液および標準溶液をエタノールやアセトンなどの有機溶媒で希釈して測定するのが有効であった。

D . 結論

CPL試験において一部の試験機関でCPLのピーク割れがみられたことから、この原因と対応策を検討した。その結果、ピーク割れの原因は、試験溶液の約80%を占める水の気化膨張率が大きいことに起因するライナー内でのオーバーロードと推測された。ただし、発生する頻度やタイミングに規則性や再現性がなく、ピーク形状も様々であった。注入条件の変更、気化容量の低減化、カラム昇温条件の変更によるピーク割れ発生時の対応策を検討した。その結果、試験溶液の注入量を減らすことによりピーク形状の改善が見られた。また、注入口温度を280に設定し、試験溶液および標準溶液をエタノールやアセトンで希釈したのちに測定する方法では良好なピーク形状が得られ、ピーク割れの対応策として最も有効と考えられた。

E . 参考文献

- 1) 六鹿元雄ら、食品用器具・容器包装等に含有される化学物質の分析に関する研究、平成26年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書、49-61 (2015)

<参考> 気化容量計算ツールの溶媒プロパティへのエタノールの追加

欄内右下の溶媒の追加をクリック

溶媒名: Ethanol、沸点(): 78.4、密度(g/cm^3): 0.789、分子量(amu): 46.07 を導入してOKをクリック

溶媒のプロパティとして Ethanol が選択可能



参考図 溶媒プロパティへのエタノールの追加