

＜その1＞ 窒素をキャリアーガスに用いたガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) によるジブチルスズ化合物試験法の妥当性確認

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	山口 未来	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	大野 浩之	名古屋市衛生研究所
研究協力者	片岡 洋平	国立医薬品食品衛生研究所
研究代表者	六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品衛生法では器具・容器包装、おもちゃ等の告示もしくは通知試験法においてガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器 (GC-FID)、GC-アルカリ熱イオン化検出器 (FTD)、GC-高感度窒素・リン酸検出器 (NPD) もしくは GC-質量分析計 (MS) を用いる試験法が示されている。これらの大部分ではキャリアーガスとしてヘリウムもしくは窒素が規定されているが、多くの試験機関がヘリウムを用いてきた。しかし、近年ヘリウムガスの供給不足が度々発生しており、今後も同様の問題が起こることが予想される。そのため、ヘリウムガスの入手が困難となった場合に対応するため、使用実態がほとんどない窒素キャリアーガスの適用性を確認しておく必要がある。

器具・容器包装、おもちゃ等の試験法のうち、GC-FID もしくは GC-NPD を用いる揮発性物質試験、塩化ビニル試験などについては、平成26年度の厚生労働科学研究において、キャリアーガスを窒素に変更した場合の検討を行い、いずれの試験においても大きな影響なく使用可能であることを報告している。

一方ジブチルスズ化合物の告示試験においては GC-MS を使用することとされており、キャリアーガスはヘリウムのみが規定されている。GC-MS では、キャリアーガスをヘリウムから窒素へ変更することによって、感度の低

下、保持時間の変化などが予想されるが、規格試験法としての窒素キャリアーガスの適用性については検証されていない。そこで本研究では、窒素をキャリアーガスに用いた GC-MS によるジブチルスズ化合物試験法の妥当性を確認した。

B. 研究方法

1. 試料

予備検討においてジブチルスズ化合物の含有が確認されなかった軟質 PVC 製おもちゃ2検体 (ボール及び空気注入玩具) を用いた。これらは神奈川県内の玩具店で2019年に購入した。

2. 試薬、試液及び標準溶液

1) 試薬

二塩化ジブチルスズ：>97.0%、酢酸ナトリウム：98.5%、以上東京化成工業株式会社製
テトラエチルホウ酸ナトリウム：98%、STREM CHEMICALS 社製

アセトン：残留農薬・PCB 分析用、酢酸：精密分析用、以上シグマアルドリッチジャパン社製

ヘキサン：残留農薬・PCB 分析用、塩酸：特級、以上富士フィルム和光純薬工業株式会社製

超純水：PURELAB flex (ELGA 社製)で精製

した水

2) 試液

酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸 12 g に水 100 mL を加えた液を第 1 液、酢酸ナトリウム 16.4 g に水 100 mL を加えた液を第 2 液とし、第 1 液と第 2 液を 3:7 の割合で混合した。

テトラエチルホウ酸ナトリウム試液：テトラエチルホウ酸ナトリウム 0.4 g を超純水に溶かして 20 mL とした。本試液は用時調製した。

3) 標準溶液

ニ塩化ジブチルスズ 100 mg にアセトン及び塩酸 100 μ L を加えて溶かした後、アセトンを加えて 100 mL とした。この液を、0.01%塩酸含有ヘキサン溶液で適宜希釈したものをジブチルスズ化合物標準溶液とした。

3. 装置

GC-MS：ガスクロマトグラフ 7890 GC、質量分析計 5975C MSD、Agilent Technologies 社製（ただし、イオン源への吸着を抑制するため²⁾、ドローアウトプレートは通常穴径 3 mm のものから 6 mm のものへ変更したもの）を用

いた（図 1）。

恒温槽：NTT-2400、EYELA 社製

遠心機：H-80R、KOKUSAN 社製

振とう機：RECIPRO SHAKER SR-2w、TAITEC 社製

エバポレーター：ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N SERIES、EYERA 社製

4. 測定条件

カラム：DB-5MS (0.25 mm i.d. \times 30 m, 膜厚 0.25 μ m, Agilent Technologies 社製)

カラム温度：45 $^{\circ}$ C (4 分間保持) $-$ 15 $^{\circ}$ C/min (昇温) $-$ 300 $^{\circ}$ C (10 分間保持)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

注入モード：スプリットレス

注入量：1 μ L

キャリアガス及び流量：He 0.8 mL/min、N₂ 0.8 mL/min (定流量)

トランスファーライン温度：280 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

四重極温度：150 $^{\circ}$ C

測定モード：SIM

定量イオン (m/z)：263

確認イオン (m/z)：261 及び 259

① イオン源



② 分解図

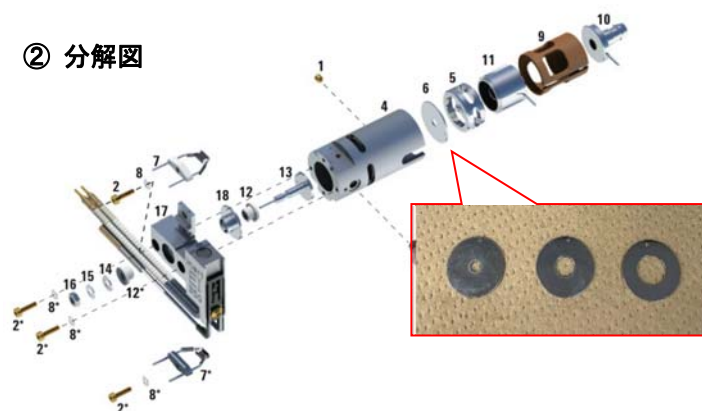


図1 GC/MS イオン源(本研究で用いた Agilent Technologies 社製のもの)

① イオン源、② 分解図 枠内がドローアウトプレート(穴径 左:3 mm, 中:6 mm, 右:9 mm)

5. 試験溶液及び測定溶液の調製

1) 試験溶液の調製

試験溶液の調製は公定法にしたがった。すなわち、細切した試料 0.5 g を共栓付きフラスコに採り、アセトン・ヘキサン混液 (3:7) 20 mL 及び塩酸 50 μ L を加え、密栓をして約 40°C の恒温槽内で一晩放置した。冷後、この液をろ紙 (定量 5C) ろ過し、ろ液及びアセトン・ヘキサン混液 (3:7) による洗液を合わせ、減圧濃縮器を用いて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した。次いで、ヘキサンを用いて 25 mL のメスフラスコに移し、さらにヘキサンを加えて 25 mL に定容した。毎分 2500 回転で約 10 分間遠心分離を行い、上澄液を試験溶液とした。

2) 測定溶液の調製

試験溶液 2 mL をとり、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL 及びテトラエチルホウ酸ナトリウム試液 1 mL を加えて直ちに密栓し 20 分間激しく振り混ぜた (振とう速度:300 回/分)。これを室温で約 1 時間静置した後、上澄液を採取し測定溶液とした。

6. 標準測定溶液の調製

各濃度のジブチルスズ化合物標準溶液 2 mL をとり、2) 測定溶液の調製と同様に操作し、得られた上澄液を標準測定溶液とした。

7. 定量

標準測定溶液から得られた定量イオンのピーク面積を用いて絶対検量線法で検量線を作成し、測定溶液中のジブチルスズ化合物を定量した。

C. 研究結果及び考察

1. 保持時間及びマススペクトルの比較

ジブチルスズ化合物標準溶液 (50 μ g/mL) を誘導体化した標準測定溶液を用いて、ヘリウ

ム及び窒素キャリアーでの保持時間及びマススペクトルを比較した。

1) 保持時間

公定法では GC/MS の操作条件でジブチルスズ化合物誘導体が約 13 分で流出する流速に調整することとされているが、ヘリウムキャリアーの場合、流速 0.8 mL/min (線速度:32.52 cm/sec) でジブチルスズ化合物誘導体の保持時間が 12.9 分であった (図 2-1)。一方、窒素キャリアーの場合は、最適線速度は 10-20 cm/sec とされており、流速をさらに遅くするかカラム内径を細くするなどの対応が必要である。しかし、流速の制御が難しくなるだけでなく、公定法で指定された測定条件から逸脱することとなる。そこで、窒素キャリアーにおいてもヘリウムと同じ流速で測定した。その結果、ジブチルスズ化合物誘導体の保持時間及びピーク形状は、いずれもヘリウムの場合とほぼ同じであった。そのため、本検討では流速を 0.8 mL/min として以降の検討を行った。

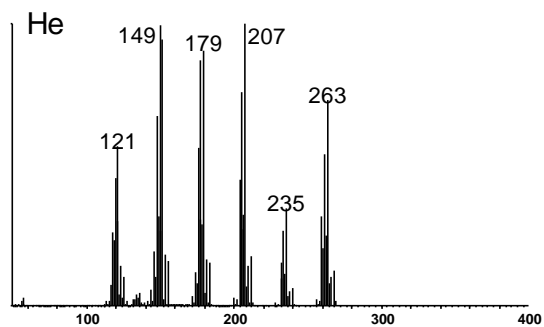
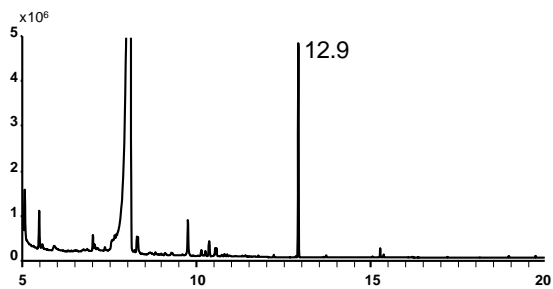
2) マススペクトル

ヘリウムキャリアーと窒素キャリアーによって得られたマススペクトルを比較したところ、窒素キャリアーではヘリウムキャリアーと比べてバックグラウンドに由来するイオンが高く検出された。しかし、ジブチルスズ化合物誘導体に由来するイオンやこれらの強度比に大きな差はなかった (図 2-2)。

2. イオン強度の比較

ジブチルスズ化合物の規格値である 50 μ g/g に相当する 1 μ g/mL のジブチルスズ化合物標準溶液を誘導体化した標準測定溶液を用いて、イオン強度を比較した。ヘリウム及び窒素キャリアーでの m/z 263 における抽出イオン (SIM) クロマトグラフを図 3 に、繰り返し 5 回測定したときの SIM モードでのピーク面積

He (流速: 0.8 mL/min)



N2 (流速: 0.8 mL/min)

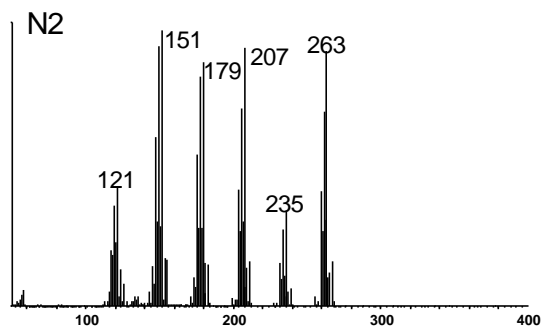
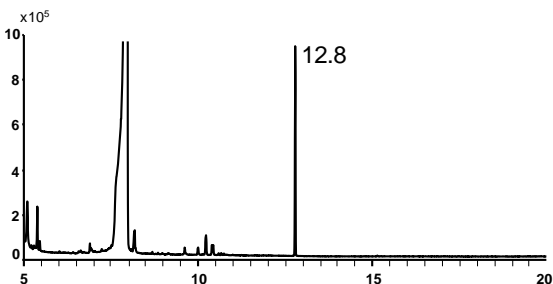


図2-1 標準測定溶液のクロマトグラム
(濃度: 50 µg/mL、SCAN 範囲: 40-800)

図2-2 標準測定溶液のマススペクトル
(濃度: 50 µg/mL)

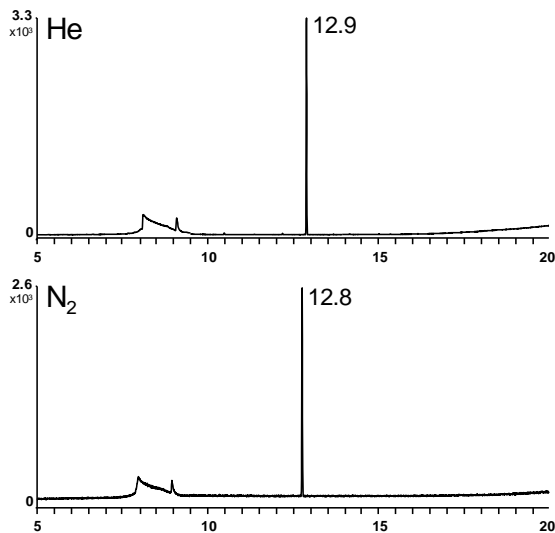


図3 ヘリウム及び窒素キャリアーでの SIM クロマトグラム
(濃度: 1 µg/mL、イオン: m/z 263)

値及び S/N を表 1 にまとめた。

ピーク面積値は、ヘリウムでは約 3,600、窒素では約 2,800 であり、約 20% 減少した。一方 S/N は、それぞれ約 1,400 及び約 120 であり、前述のように窒素キャリアーの場合はノイズレベルが高いため S/N は 10 以下に大きく低下した。しかし、S/N が 100 以上であれば、適否判定は可能と考え、適用に問題はないと判断した。

表 1 ピーク面積値と S/N の比較

Trial	Peak area		S/N	
	He	N ₂	He	N ₂
1	3584	2840	1500	129
2	3568	2763	1050	121
3	3591	2731	1510	135
4	3694	2727	1530	106
5	3673	2817	1510	112
Ave	3622	2776	1420	121

3. ジブチルスズ化合物試験法の妥当性確認

1) 限度分析法の妥当性確認

告示におけるジブチルスズ化合物試験は、試験溶液と標準溶液におけるジブチルスズ化合物誘導体のピーク面積値を比較して適否判定を行う限度試験である。そこで、「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて」（食安発 1222 第 8 号 平成 26 年 12 月 22 日）³⁾を参考に、本法の妥当性確認を行った。

ジブチルスズ化合物を含まない PVC 製玩具 2 検体（試料 1 及び試料 2）を用いて試験溶液を調製し、これに規格値 1 µg/mL 相当となるようにジブチルスズ化合物標準溶液を添加した。この液を添加試料とし、それぞれ 5 併行で測定溶液を調製し、各 1 回ずつ測定した。また、規格値 1 µg/mL のジブチルスズ化合物標準溶液から 1 併行で標準測定溶液を調製し、

5 回繰り返し測定した。

標準測定溶液におけるジブチルスズ化合物誘導体のピーク面積値 (SI_{standard}) の平均値に対する添加試料の分析により得られたピーク面積値 (SI_{sample}) の平均値の比 (SI_{ratio}) は、試料 1 では 0.96、試料 2 では 0.94 であった。また、SI_{standard} の相対標準偏差 (S_{standard}) は 4.9、SI_{sample} の相対標準偏差 (S_{sample}) は 5.4 及び 4.2 であった (表 2)。いずれも「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて」における限度試験の目標値 (SI_{ratio} : 0.9-1.0、S_{standard} : < 5、S_{sample} : < 15) を満たしており、本法の性能は限度分析法として妥当であると判断した。

2) 定量分析法の妥当性確認

試料 1 及び試料 2 から得られた測定溶液を、それぞれ試験者 2 名が 1 日 2 併行で定量し、その定量値を用いて定量分析法としての妥当性確認を行った。得られたジブチルスズ化合物誘導体の真度 (%) から一元配置の分散分析により併行精度 (RSD_F%) 及び室内精度 (RSD_R%) を求めた。ただし、室内精度には日間及び実施者が異なることも要因として含む (表 3)⁴⁾。それぞれの試料における真度は 99.4 及び 98.8%、併行精度は 3.1 及び 6.3%、室内精度は 6.1 及び 9.9% であった。真度は CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL (Twenty-Seventh edition)⁵⁾ が定めるサンプル濃度 100 mg/kg における目標値 (90-107%) を満たした。また RSD_F 及び RSD_R は、GUIDELINES ON GOOD LABORATORY PRACTICE IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS (CAC/GL 40)⁶⁾ が定める試験室内妥当性確認の基準 (サンプル濃度 > 1 mg/kg の場合の RSD_F : 10% 及び RSD_R : 16%) を満たした。以上から本法の性能は定量分析法として妥当であると判断した。

表2 限度試験の妥当性確認における結果と性能パラメーター

Trial	Peak area		
	SI _{standard}	SI _{sample 1}	SI _{sample 2}
1	3279	3122	3118
2	3522	3303	3371
3	3641	3504	3383
4	3747	3542	3505
5	3539	3522	3310
Ave	3546	3399	3337
SI _{ratio}	-	0.96	0.94
S _{standard} or S _{sample}	4.9	5.4	4.2

SI: ピーク面積値、SI_{ratio}: 標準測定溶液と測定溶液のピーク面積値の比、
s: ピーク面積値の相対標準偏差 (n=5)

表3 定量試験の妥当性確認における結果と性能パラメーター

Sample	Trial	Operator 1			Operator 2			Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd			
1	1	95.7	93.6	103.0	95.5	104.0	97.0	99.4	3.1	6.1
	2	93.5	96.7	101.0	100.8	110.9	101.0			
2	1	95.1	95.3	97.0	102.0	114.1	83.0	98.8	6.3	9.9
	2	93.1	100.3	103.0	98.7	103.8	100.0			

ただし、RSD_Rには日間及び実施者が異なることも要因として含む。

D. 結論

窒素をキャリアガスに用いた GC-MS によるジブチルスズ化合物試験法の妥当性を確認した。キャリアガスをヘリウムから窒素へ変更しても、保持時間及びマススペクトルは大きく変わらなかった。ただし、ヘリウムと比べて窒素では感度は約 25%の減少となり、バックグラウンドのノイズも増加した。そのため、S/N は 1/10 以下に低下した。しかし、限度分析法及び定量分析法のいずれにおいて

も規格試験として適用可能な性能を有していた。

E. 参考文献

- 1) 羽石奈穂子：平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 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 統括・分担研究報告書 ガスクロマトグラフィーを用いる試験法におけるキャリアガスの変更による

- 影響、95-111 (2015)
- 2) Agilent5977 シリーズEI イオン源 セレクション ガイド (https://www.chem-agilent.com/pdf/low_5991-2106JAJp.pdf, 最終アクセス日 令和2年5月12日)
 - 3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 (平成26年12月22日食安発1222第8号) 食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて (2014)
 - 4) 渡邊敬浩・松田りえ子：食品分析結果のただしさ～信頼性保証の実践とその意味～ (ISBN 4-939027-25-2)、林純薬工業株式会社、p.127 (2011)
 - 5) CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL (Twenty-Seventh edition) (ISSN 1020-8070), Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2019)
 - 6) GUIDELINES ON GOOD LABORATORY PRACTICE IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS, CAC/GL 40-1993