

＜その 7＞ HS-GC を用いた相対モル感度 (RMS) 法による スチレン類 (揮発性物質) の分析法の検討

研究代表者	阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	近藤 翠	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	岩越 景子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	大橋 公泰	(一財) 日本文化用品安全試験所
研究協力者	永井 慎一郎	(一財) 東京顕微鏡院
研究協力者	早川 雅人	(一財) 化学研究評価機構
研究協力者	渡辺 一成	(一財) 化学研究評価機構
研究代表者	藤原 恒司	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	酒井 信夫	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

相対モル感度 (Relative molar sensitivity, RMS) とは、日本農林規格「食品における相対モル感度を利用した定量法に関する一般要求事項」

(JAS0031:2025) において、「基準とするある物質 X の単位物質質量当たりのクロマトグラフの検出部の応答に対する、別の物質 Y の単位物質質量当たりの検出部の応答の比」と定義される数値である。基準とするある物質 (基準物質) と別の物質 (測定対象物質) が決まっていれば両者に固有の一定の値となる。これはすなわち、基準物質 X と測定対象物質 Y の RMS 値があらかじめ明らかであれば、「基準物質 X のモル濃度」、「基準物質 X の応答値」及び「測定対象物質 Y の応答値」から、「測定対象物質 Y のモル濃度」を求めることができ、「測定対象物質 Y」の標準品がなくても定量が可能となる。また、測定対象物質が複数あったとしても、基準物質 X に対するそれぞれの RMS 値が分かっていれば、一つの基準物質 X で複数の測定対象物質を定量可能となる (シングルリファレンス法)。さらに、「RMS 値」及び「基準物質 X のモル濃度」が計量学的に精確な国際単位系 (SI) トレーサブルな方法で求められていた場合、得られた「測定対象物質 Y のモル濃度」も計量学的に精確であると言える。そのため、標準品の入手が

困難であったり、標準品が不安定であったりする天然物分析において汎用される。既に食品添加物の規格基準に公定法として複数の成分規格・保存基準各条に採用されており、日本農林規格においてもりんごジュース中のクロロゲン酸の定量分析に採用されている。さらに、ISO 規格にも今後採用が見込まれている。

RMS 法は検出器に導入された化合物の量に対して検出器の応答が比例関係を示す場合のみ適用できるため、HPLC (UV-VIS 又は PDA 検出器) だけではなく、対象とする化合物によっては GC-FID にも用いることができる。実際に食品添加物では GC-FID を用いる RMS 法として、カラシ抽出物中のイソチオシアン酸アリの定量法 (基準物質: デカン) が規定されている。一方これまで試料導入法としてヘッドスペース (HS) ガス導入への適用例は検討されていない。

スチレン類試験法はポリスチレンを主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装におけるスチレン類 (トルエン (TO)、エチルベンゼン (EB)、スチレン (ST)、イソプロピルベンゼン (IPB) 及びプロピルベンゼン (NPB)) の残存量を測定する試験法であり、いわゆる通知試験法¹⁾に示されている。このうち、分析法 2 (以降、通知分析法 2 とする) として HS-GC 法が規

定されている。この試験法では、スチレン類の各標準品と内標準物質を含むスチレン類混合標準原液を調製し、それぞれの検量線を作成することとされている。また、各標準品の純度は97%以上、98%以上又は99%以上の規定があり、TOはJIS K8680において99.5%以上とされているが、実際の試薬の正確な純度は不明である。また、市販の化学分析用標準液を用いることもできるとされているが、この正確な純度も不明である。このため、スチレン類の試験法にSIトレサブルなRMS法が適用可能であれば、標準品（基準物質）は一つとなり検量線作成の手間が軽減ができ、さらにより正確な定量値を得ることができるようになると期待された。

そこで本研究では、HS-GC法へのRMS法の適用可能性を検証するため、スチレン類（揮発性物質）試験法のHS-GC法を対象に、RMS法を検討した。

B. 研究方法

1. 試料

ポリスチレン（PS）製容器1検体。令和2年にインターネットで購入したものを用いた。

2. 試薬、標準溶液等

2. 1 試薬、標準品

本研究で用いた試薬及び標準品は表1に示した。

表1 本研究で用いた試薬及び標準品

試薬名	略号	グレード又は純度*1	試薬会社*2
トルエン	TO	インフィニティピュア、99.8+% (Capillary GC)	和光
エチルベンゼン	EB	-	化成
スチレン	ST	-	化成
イソプロピルベンゼン	IPB	-	化成
プロピルベンゼン	NPB	-	化成
1,3,5-トリメチルベンゼン	1,3,5-TMB	-	化成
1,2,4-トリメチルベンゼン	1,2,4-TMB	特級	和光
1,4-ジエチルベンゼン	DEB	> 98.0%	化成
1,2-ジクロロベンゼン	DCB	-	化成
ヘキサン酸メチル	-	特級	和光
<i>n</i> -デカン	-	GC用標準物質	化成
<i>n</i> -ノナン	-	GC用標準物質	化成
4-ヒドロキシ安息香酸プロピル	PrHBA	容量分析用、 > 99.0%以上 (T)	化成
1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- <i>d</i> ₄	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	認証標準物質	和光
3-(トリメチルシリル)-1-プロパン-	DSS- <i>d</i> ₆	認証標準物質	和光
1,1,2,2,3,3- <i>d</i> ₆ -スルホン酸ナトリウム			
ジメチルスルホキシド- <i>d</i> ₆	DMSO- <i>d</i> ₆	NMR用	和光
アセトン- <i>d</i> ₆	-	NMR用	関東

*1ー：試薬に不記載

*2 和光：富士フイルム和光純薬株式会社、化成：東京化成工業株式会社、関東：関東化学株式会社

2. 2 標準原液、標準溶液及び試液

①RMS 法

内部標準溶液：*n*-ノナン約 0.5 g を量りとり、DCB で 1 L に定容した。

スチレン類標準原液：あらかじめ内部標準溶液を少量入れた 10 mL のメスフラスコに、TO、EB、IPB、NPB 又は ST 約 100 mg を精密に量りとり、内部標準溶液でそれぞれ定容した（各 10,000 µg/mL）。

スチレン類混合標準原液：スチレン類標準原液各 2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した（各 1,000 µg/mL）。

スチレン類混合標準溶液（100 µg/mL）：スチレン類混合標準原液 2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した。

スチレン類混合標準溶液（10 µg/mL）：スチレン類混合標準溶液（100 µg/mL）2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した。

基準物質原液：あらかじめ内部標準溶液を少量入れた 20 mL のメスフラスコに *n*-デカン約 800 mg を精密に量りとり、内部標準溶液で定容した。ヘキサン酸メチルを用いた際は約 1 g を精密に量りとり、同様に操作した（*n*-デカン：40,000 µg/mL、ヘキサン酸メチル：50,000 µg/mL）。

混合基準物質原液：基準物質原液各 2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した（*n*-デカン：4,000 µg/mL、ヘキサン酸メチル：5,000 µg/mL）。

混合基準物質溶液（400・500 µg/mL）：混合基

準物質原液 2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した。

混合基準物質溶液（40・50 µg/mL）：混合基準物質溶液（400・500 µg/mL）2 mL を正確に量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した。

②公定法・通知試験法 2

DCB 試液：1,3,5-TMB 50 mg を量りとり、DCB で 200 mL に定容した。

スチレン類標準原液（公定法）：あらかじめ DCB 試液を少量入れた 10 mL のメスフラスコに TO、EB、IPB、NPB 又は ST 約 100 mg を精密に量りとり、DCB 試液で定容した（各 10,000 µg/mL）。

スチレン類混合標準原液（公定法）：スチレン類標準原液（公定法）各 2 mL を正確に量りとり、DCB 試液で 20 mL に定容した（各 1,000 µg/mL）。

3. 装置及び器具

NMR 装置：JNM-ECZ600R/S1、日本電子株式会社製

ウルトラマイクロ天秤：XP2U、METTLER TOLEDO 株式会社製

セミマイクロ天秤：Cubis MSA225p、ザルトリウス・ジャパン株式会社

ソニケーター：ブランソニック 卓上型超音波洗浄器 B2510J-MH、日本エマソン株式会社

GC-FID、HSS：表 2 にまとめた。

表 2 各試験所で使用した装置

機関	GC-FID（メーカー）＊	HSS（メーカー）＊
国立衛研	8890 GC System (A)	8697 headspace sampler (A)
A	7890B GC System (A)	7697A headspace sampler (A)
B	GC-2010 (S)	HS-20 (S)
C	GC-2030 (S)	HS-20NX (S)
D	GC-2010 Plus (S)	TurboMatrix HS-40 (P)
E	GC-2010 (S)	TurboMatrix HS-40 (P)
F	GC-2030 (S)	TurboMatrix HS-40 (P)

＊A：アジレントテクノロジー社製、S：島津製作所製、P：パーキンエルマー社製

4. RMS の算出

4. 1 定量 NMR による標準品の純度決定

① NMR 用試料溶液の調製

スチレン類は揮発しやすいため、あらかじめ溶媒を調製してそれにスチレン類を添加し、その時の質量を精密に量り試料採取量とした。すなわち、ウルトラマイクロ天秤を用いて、DSS-*d*₆ 標準物質約 5 mg を精密にスクリーブバイアルに量りとり、DMSO-*d*₆ 5 mL を加えて溶解させた。この溶液に TO 約 40 mg (約 50 μL) を精密に量って加えたものを NMR 用試料溶液とした。EB、IPB、NPB 及び ST についても同様に操作して各 NMR 用試料溶液を調製した。各 NMR 用試料溶液約 0.6 mL を 5 mm の NMR チューブに移し NMR 分析に付した。

また、ウルトラマイクロ天秤を用いて、1,4-BTMSB-*d*₄ 標準物質約 5 mg を精密にスクリーブバイアルに量りとり、セミマイクロ天秤を用いて *n*-デカン約 50 mg (60 μL) を精密に量り取った後、アセトン-*d*₆ 5 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料溶液とした。NMR 用試料溶液 0.6 mL を 5 mm の NMR チューブに移し、トーチバーナーで封管して NMR 分析に付した。

NMR 用試料溶液はそれぞれ *n*=3 で調製し、*n*=1 につき 3 回測定を行った。

② 測定条件

第 10 版食品添加物公定書に記載の条件を参考にして設定した。各条件は以下の通り。

デジタル分解能：0.25 Hz

スピニング：オフ

¹³C デカップリング：あり (MPF8 (取込み時間のみ))

観測スペクトル幅：-5~15 ppm

パルス角：90°

繰り返しパルス待ち時間：60 秒

ダミースキャン：2 回

積算回数：8 回

測定温度：25°C

③ 純度の計算

取得した FID に対して窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 2 倍に増やした後、フーリエ変換を行った。次に、位相及びベースラインを補正し、定量用の ¹H-NMR スペクトルとした。このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い、下記の式 (1) を用いて試料の純度を算出した。複数のシグナルを使用した場合は、それらの純度を平均して、試料の純度 (%) とした。

$$\text{式 (1)} \quad P_A = \frac{S_A}{S_B} \times \frac{H_B}{H_A} \times \frac{M_A}{M_B} \times \frac{W_B}{W_A} \times P_B$$

ただし、P：純度 (%)

S：シグナル面積

H：プロトン数

M：分子量

W：秤量値 (mg)

A：分析対象化合物

B：1,4-BTMSB-*d*₄ 又は DSS-*d*₆

なお、定量に用いたシグナル及び分裂パターンを以下の表 3 に示した。なお、これらのケミカルシフト値は 1,4-BTMSB-*d*₄ 又は DSS-*d*₆ のシグナルを 0 ppm としたときの値で示した。

表 3 定量に用いたケミカルシフト値

化合物	ケミカルシフト値*1,*2
TO	2.3 (s)、7.2 (m)
EB	1.2 (t)、7.2 (m)
IPB	1.2 (d)、2.9 (sep)、7.2 (m)
NPB	0.9 (t)、1.6 (m)、7.2 (m)
ST	5.3 (dd)、5.9 (dd)、6.8 (dd)、7.2 (m)
<i>n</i> -デカン	0.6 (s or m)、1.0 (t)
ヘキサン酸 メチル	0.9 (t)、1.3 (m)、1.5 (q)、2.3 (t)、3.6 (s)

*1 数字の単位は ppm、*2 () は分裂パターンを示す (s：シングレット、d：ダブルット、dd：ダブルダブルット、t：トリプレット、sep：セプテット、m：マルチプレット)。

4. 2 検量線の作成

①検量線用スチレン類混合標準溶液の調製

スチレン類混合標準溶液 (10 µg/mL)、スチレン類混合標準溶液 (100 µg/mL) 及びスチレン類混合標準原液をそれぞれ 1、2 及び 5 mL とり、内部標準溶液で 20 mL にそれぞれ定容したものを検量線用スチレン類混合標準溶液とした。なお、各溶液中のスチレン類の濃度はそれぞれ 0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 及び 250 µg/mL となり、材質あたりの濃度に換算すると、それぞれ 10、20、50、100、200、500、1,000、2,000 及び 5,000 µg/g となる。

②検量線用基準物質混合標準溶液の調製

混合基準物質溶液 (40・50 µg/mL)、混合基準物質溶液 (400・500 µg/mL) 及び混合基準物質原液をそれぞれ 1 mL、2 mL 及び 5 mL 量りとり、内部標準溶液でそれぞれ 20 mL に定容したものを検量線用基準物質混合標準溶液とした。なお、各溶液中の基準物質の濃度は、*n*-デカン は 2、4、10、20、40、100、200、400 及び 1,000 µg/mL、ヘキサン酸メチルは 2.5、5、12.5、25、50、125、250、500 及び 1,250 µg/mL となる。

③測定

検量線用スチレン類混合標準溶液又は検量線用基準物質混合標準溶液 2 mL を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、セプタム及びアルミキャップで密封後、140°C に保ちながら攪拌しつつ 60 分間加熱した。加熱後、気相 1 mL を GC-FID に注入し、以下の測定条件で測定した。

④測定条件

カラム : DB-WAX (0.25 mm×30 m、膜厚 0.5 µm、アジレントテクノロジー社製)

カラム温度 : 60°C (1 分保持) -6°C/分-150°C -30°C/分-180°C

注入口温度 : 220°C

注入方法 : スプリット (スプリット比 25 : 1)

検出器温度 : 220°C

キャリアーガス : N₂

流速 : 0.87 mL/min

バイアル加熱温度 : 140°C

バイアル加熱時間 : 60 分

ループ温度 : 145°C

トランスファーライン温度 : 155°C

気相導入量 : 1 mL

⑤検量線の作成

検量線用スチレン類混合標準溶液又は検量線用基準物質混合標準溶液の濃度を横軸に、③測定 で得られた内部標準比を縦軸にとった検量線を各化合物について作成した。ただし、検量線用スチレン類混合標準溶液及び検量線用基準物質混合標準溶液の濃度は、4. 1 定量 NMR による純度測定 にて得られた純度を用いて補正した。

4. 3 RMS の算出

4. 2 検量線の作成 で作成したスチレン類の各検量線の傾きを、*n*-デカン及びヘキサン酸メチルの検量線の傾きでそれぞれ除し、各スチレン類及び各基準物質の RMS を求めた。

5. 含量の測定

5. 1 RMS 法

①添加用標準溶液の調製

添加用標準溶液 (RMS 法) : TO、IPB 及び ST 標準原液各 3 mL、EB 及び NPB 標準原液各 4 mL を量りとり、内部標準溶液で 50 mL に定容した。この液 2.5 mL を量りとり、内部標準溶液で 50 mL に定容した (TO、IPB 及び ST:60 µg/mL、EB 及び NPB : 80 µg/mL。なお、材質あたりの濃度に換算するとそれぞれ 1200 及び 1600 µg/g となる。)

②試験溶液の調製

細切した試料 0.1 g を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、内部標準溶液 2 mL を加え、セプタム及びアルミキャップで密封した。

③添加試験溶液の調製

細切した試料 0.1 g を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、添加用標準溶液 (RMS 法) 2 mL を加え、セプタム及びアルミキャップで密封し

た。

④測定用混合基準物質溶液の調製

混合基準物質原液を 5 mL 量りとり、内部標準溶液で 20 mL に定容した (*n*-デカン : 1000 µg/mL、ヘキサン酸メチル : 1250 µg/mL)。この液 2 mL を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、セプタム及びアルミキャップで密封したものを測定用混合基準物質溶液とした。

⑤試験溶液、添加試験溶液及び測定用混合基準物質溶液の測定

4. 2 ③及び④と同様に測定した。ただし、カラム内残留成分の溶出を目的としてを目的として、カラム温度の最後に 180℃で 7.5 分間保持を追加した。また、試験溶液及び添加試験溶液はそれぞれ *n*=3 で調製し、各 *n*=1 で測定した。また、測定用混合基準物質溶液は *n*=1 で調製し、*n*=1 で測定した。

⑥定量

各基準物質に対する各スチレン類の RMS を用い、下記の式 (2) に従い、試料中に含まれるスチレン類の含有量を算出した。

$$(式 2) \quad C = \frac{A_{sam}}{A_{std}} \times C_{std} \times \frac{m_{sam}}{m_{std}} \times \frac{1}{RMS} \times 2 \times \frac{1}{W}$$

ただし、*C* : 定量値 (µg/g)

*C*_{std} : 基準物質濃度 (µg/mL)

*A*_{sam} : 試験溶液中の測定化合物の内標比

*A*_{std} : 基準物質の内標比

*m*_{sam} : 揮発性物質のモル質量 (g/mol)

*m*_{std} : 基準物質のモル質量 (g/mol)

RMS : 基準物質に対する揮発性物質の RMS

W : 物質の秤量値 (g)

⑦他機関での測定

国立衛研にて調製した検量線用スチレン類混合標準溶液 (25 µg/mL) 及び基準物質混合標準溶液 (*n*-デカン 100 µg/mL、ヘキサン酸メチル 125 µg/mL) を HS バイアルに入れ密封した後、各機関へ宅急便で送付した。各機関は、受領後

そのまま又は開封しそれぞれ適した HS バイアルに詰め直し、4. 2 ④測定条件にしたがって測定した。ただし、装置によって設定できない条件等は適宜変更した。

5. 2 通知試験法 2

①添加用標準溶液の調製

添加用標準溶液 (通知試験法) : TO、IPB 及び ST 標準原液各 3 mL、EB 及び NPB 標準原液各 4 mL を量りとり、DCB 試液で 50 mL に定容した。この液 2.5 mL を量りとり、DCB 試液で 50 mL に定容した (TO、IPB 及び ST : 60 µg/mL、EB 及び NPB : 80 µg/mL。なお、材質あたりの濃度に換算するとそれぞれ 1,200 及び 1,600 µg/g となる。)

②試験溶液の調製

細切した試料 0.1 g を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、DCB 試液 2 mL を加え、セプタム及びアルミキャップで密封した。

③添加試験溶液の調製

細切した試料 0.1 g を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、添加用標準溶液 (通知試験法) 2 mL を加え、セプタム及びアルミキャップで密封した。

④検量線用混合標準溶液の調製

スチレン類混合標準原液を 1 mL、2.5 mL、5 mL、7.5 mL 及び 10 mL 量りとり、DCB 試液でそれぞれ 20 mL に定容した。この液 2 mL を 20 mL 容の HS バイアルに量りとり、セプタム及びアルミキャップで密封したものを検量線用混合標準溶液とした。

⑤試験溶液、添加試験溶液及び検量線用混合標準溶液の測定

以下に示すもの以外は 4. 2 ③及び④と同じ条件で測定した。ただし、カラム内残留成分の溶出を目的としてを目的として、カラム温度の最後に 180℃で 7.5 分間保持を追加した。また、試験溶液及び添加試験溶液はそれぞれ *n*=3 で調製し、各 *n*=1 で測定した。

注入方法 : スプリット (スプリット比 20 : 1)

流速：1.2 mL/min

⑥定量

検量線用混合標準溶液の濃度を横軸に、1,3,5-TMB を内標としてスチレン類との内標比を縦軸にとった検量線をそれぞれ作成した。ただし、検量線用混合標準溶液の濃度は、**4. 1 定量 NMR による純度測定** にて得られた純度を用いて補正した。試験溶液を測定して得られた面積比とこの検量線から、試料中の各スチレン類の含有量を算出した。

C. 結果及び考察

1. 測定条件の検討

1. 1 装置条件

HSS を用いたスチレン類の分析法としては、スチレン類試験法の分析法 2（通知試験法 2）¹⁾の他にも、三宅ら²⁾や阿部ら³⁾が報告している。本研究では、通知試験法 2 を基本としたが、一部三宅らの条件も参考にした。具体的にはスプリット比を三宅らの条件である 25 : 1 とし、また、試料を測定する場合は、カラム内残留成分

の溶出を目的としてを目的として、カラム温度の最後に 180℃で 7.5 分間保持を追加した。

1. 2 内部標準物質及び基準物質の選定

試料導入が HSS のため、導入補正のため内部標準物質が必要である。また、RMS 法では基準物質が必要不可欠である。そこで初めに最適な内部標準物質及び基準物質の選定を行った。

候補として、通知試験法 2 における内部標準物質である 1,3,5-TMB、通知試験法の分析法 1（通知試験法 1）における内部標準物質である 1,4-ジエチルベンゼン（DEB）、1,3,5-TMB の異性体である 1,2,4-TMB を選択した。さらに、スチレン類の分子量が 92～120、沸点が 110～159℃であったことから、同程度の分子量及び沸点である 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル（PrHBA）、*n*-ノナン、*n*-デカン及びヘキサ酸メチルも候補とした。これらのクロマトグラムを図 1～3 に示し、対象化合物及び各候補物質の分子量、沸点及び GC 分析の結果を表 4 にまとめた。

表 4 対象化合物、基準物質及び内標候補物質の化合物情報

化合物名	分子量	沸点 (℃)	保持時間 (分)	GC 分析の結果
TO	92.14	110	4.78	問題なし
EB	106.17	136	6.09	問題なし
IPB	120.19	155	6.88	問題なし
NPB	120.19	159	7.55	問題なし
ST	104.15	145	8.54	問題なし
1,4-DEB	134.22	184	9.68	ピークが割れる。
1,2,4-TMB	120.20	169	9.03	高濃度で試薬に含まれる 1,3,5-TMB が ST と重なる可能性あり。
PrHBA	180.20	133	-	検出されない。
<i>n</i> -ノナン	128.26	150	3.11	良好なピーク形状
<i>n</i> -デカン	142.29	174	3.96	わずかにテーリングするが良好なピーク形状。食品添加物公定書にて RMS として使用されている。
ヘキサ酸 メチル	130.19	150	7.12	良好なピーク形状。スチレン類の保持時間の中央付近に検出された。

通知試験法 2 における内部標準物質である 1,3,5-TMB は今回の測定を通じて ST のピークと重複した。また、1,4-DEB はピークが割れてしまい、加熱温度、濃度及びスプリット比を変えて測定したが改善は見られなかった。1,2,4-TMB は、ピーク形状も良好であり、ST と分離が出来ていた。しかし、高濃度にすると試薬に元々微量含まれている 1,3,5-TMB 等の異性体が ST と重なった。*n*-デカンはテーリングがみられ TO と重なる可能性があり、ヘキサン酸メチルは、ピーク形状は良好であったが IPB 及び NPB と重複した。PrHBA は本測定条件ではピークが検出されなかった。内部標準物質は基準物質とスチレン類のいずれとも重複してはならないため、本検討では *n*-ノナンを内部標準物質とすることとした。一方基準物質は、スチレン類とは別に測定するため保持時間は重なっても良いが、内部標準物質と重複してはならない。また、食品添加物公定書において *n*-デカンはすでに基準物質として使用されていること、ヘキサン酸メチルには異性体由来と思われるピークが検出されなかったことから、*n*-デカン及びヘキサン酸メチルを基準物質として選定し、以降の検討を行った。

2. RMS の算出

2. 1 標準品の絶対純度の算出

初めに、スチレン類及び基準物質の絶対純度を定量 NMR によって求めた。計算に用いたシグナル等の情報を示した NMR スペクトルを図 4 に、求めた純度を表 5 にまとめた。以降の濃度計算等はこの純度で補正した値を用いた。なお、スチレン類はいずれも 99.5%以上の純度であり、高純度な試薬が入手可能であることが明らかとなった。

表 5 qNMR によって算出した試薬の純度

試薬	純度 (RSD%) *1
TO	99.5902 (0.18)
EB	99.9625 (0.19)

IPB	99.6022 (0.14)
NPB	99.8864 (0.26)
ST	100.2545 (0.15)
<i>n</i> -デカン*2	99.9710 (0.20)
	99.8046 (0.23)
	100.0571 (0.15)
ヘキサン酸メチル	99.6566 (0.17)

*1：数値は 3 試行の平均値

*2：*n*-デカンは 3 つの試薬を用いたため、その都度正確な純度を算出し補正した。

2. 2 RMS 値の算出

①RMS 値の算出方法

溶液中の物質の物質質量 (モル濃度、M) とクロマトグラフィーにおける応答値 A が比例関係にあるとき、その関係式は式 (3) で表される。このときの a はモル感度係数であり、横軸にモル濃度、縦軸に応答値をとった場合の検量線の傾きを意味している。

$$\text{式 (3)} \quad A = aM$$

一方 RMS の定義は、「基準とするある物質 X の単位物質質量当たりのクロマトグラフの検出部の応答に対する、別の物質 Y の単位物質質量当たりの検出部の応答の比」とされ、これは式 (4) で表すことができる。

$$\text{式 (4)} \quad \text{RMS} = \frac{A_x}{M_x} \div \frac{A_y}{M_y} = \frac{a_x}{a_y}$$

つまり、RMS 値は、基準物質 X と測定対象物質 Y のモル濃度を横軸に、応答値を縦軸にとって検量線を作成したときの傾きの比から求めることができる。

一方 HS-GC の場合、内部標準物質で導入の補正を行うのが一般的であることから、本研究では内部標準物質によって補正した検量線の傾きから RMS 値を求めることとした。

②検量線の濃度範囲の検討

標準溶液の濃度範囲は、上限は公定法を参考に 250 $\mu\text{g/mL}$ （材質あたりでは 5,000 $\mu\text{g/g}$ に相当）とし、下限はスチレン類の各ピークのシグナルノイズ（SN）比が 10 以上で、かつ戻し値が 10%以内となった 2.5 $\mu\text{g/mL}$ とした。この範囲におけるスチレン類の検量線の決定係数は ≥ 0.99999 であった。

一方基準物質の濃度範囲は、上限は 250 $\mu\text{g/mL}$ の TO の面積値と同等になる濃度とし、下限は SN 比 10 以上かつ戻し値 10%以内の値とした。その結果、*n*-デカン及びヘキサン酸メチルの濃度範囲は 10～1,000 $\mu\text{g/mL}$ 及び 12.5～1,250 $\mu\text{g/mL}$ となり、その時の検量線の決定係数はどちらも ≥ 0.99999 となった。

なお、内部標準溶液の濃度は 250 $\mu\text{g/mL}$ の TO の面積値と同等になる濃度とした。また、この濃度は通知試験法 2 よりも 2 倍濃い濃度となる。

③RMS 値の算出

②検量線の濃度範囲の検討 において決定した濃度範囲におけるスチレン類及び基準物質の検量線の式を表 6 に示した。ただし、各濃度点の標準溶液及び基準物質溶液はそれぞれ $n=1$ で調製したものを $n=3$ で測定し、各濃度点は平均せずにプロットし 1 本の検量線を作成した。これらの式の傾きの値を用いて RMS 値を算出し表 7 に示した。

表 6 標準品及び基準物質の検量線の式

化合物	検量線の式
TO	$y=0.32202x$
EB	$y=0.19822x$
IPB	$y=0.14755x$
NPB	$y=0.12206x$
ST	$y=0.14626x$
<i>n</i> -デカン	$y=0.14540x$
ヘキサン酸メチル	$y=0.093660x$

表 7 各対象化合物の各基準物質に対する RMS 値

化合物	基準物質	
	<i>n</i> -デカン	ヘキサン酸メチル
TO	2.215	3.438
EB	1.363	2.116
IPB	1.015	1.575
NPB	0.8395	1.303
ST	1.006	1.562

3. RMS 法の検証

3. 1 RMS 法と通知試験法 2 による定量値の比較

2. RMS の算出 で求めた RMS 値が正しいか評価するため、RMS 法及び通知試験法 2 を用いて試料中のスチレン類を定量し、その含量を比較することとした。ただし、入手可能な PS 試料中のスチレン類は微量である場合があることから、PS 試料に標準品を添加した試料（添加試料）を用いた。

RMS 法と通知試験法 2 を用いて測定した結果を表 8 に示した。添加用標準溶液はそれぞれ別々に調製したが、添加量の差は 0～4 $\mu\text{g/g}$ (0.0～0.3%) 程度であったことから、両者には差はないものとして考察した。

RMS 法では基準物質の違いによっていずれも 1%程度の差がみられた。RMS 法と通知試験法 2 による含有量の差は、ST 以外では 0.7～2.9%程度であった。特に *n*-デカンを基準物質とした場合は 0.7～1.9%の差であり、ほぼ同程度の値が得られることが確認された。また、いずれの相対標準偏差も 1%未満であり、繰り返し精度も良好であった。一方 ST については、試料に ST が含まれているため添加量と定量値が異なっていたが、RMS 法と通知試験法 2 で 4%程度の差がみられた。そこで、添加していない試料（ブランク試料）の定量値を差し引いたところ、同程度の定量値となった。ブランク試料の定量値を差し引く前の差が大きかったのは、

表8 RMS 法と通知試験法2の定量値 (μg/g) の比較

分析法	TO	EB	IPB	NPB	ST	ST-BK*
添加量 (μg/g) (通知/RMS)	1232/1228	1754/1752	1281/1277	1597/1596	1212/1212	
通知試験法2	1216 (0.8)	1730 (0.5)	1271 (0.4)	1575 (0.4)	1425 (0.7)	1178 (0.8)
RMS 法 (<i>n</i> -デカン)	1194 (0.3)	1711 (0.4)	1255 (0.4)	1565 (0.4)	1380 (0.1)	1161 (0.2)
RMS 法 (ヘキサン酸メチル)	1181 (0.3)	1693 (0.4)	1242 (0.4)	1548 (0.4)	1365 (0.1)	1149 (0.2)

数値は3試行の平均値 (相対標準偏差%)

* : 添加試料の定量値からブランク試料の定量値を差し引いた数値

本検討において、通知試験法2の条件で測定した際にSTのメモリーが検出しており、その分高い値になったと考えられた。

以上の結果から、本検討で算出したRMS値を用いたRMS法は通知試験法2とほぼ同程度の定量値が得られることが確認された。

3.2 測定条件の違いによる定量値への影響

HSSの加熱温度や加熱時間、キャリアガスの種類等の測定条件の違いがRMS法による定量値に及ぼす影響の程度を検討した。すなわち、検量線用スチレン類混合標準溶液の25 μg/mL (材質当たりに換算すると500 μg/g)の溶液を試料とみなして測定し、得られた値を式(2)に導入し試料中の含量として算出し、その値を比較した。測定条件は4.2④測定条件を基本とし、HSS加熱温度(±2℃、表9)、HSS加熱時間(±2分、表10)、試料量(±2mL、表11)、バイアルサイズ(10mL、表12)、キャリアガス(窒素、表13)及びカラムメーカ

ー(InertCap Pure-WAX、表14)を変更して測定した。

HSS加熱温度、HSS加熱時間、試料量、バイアルサイズ、キャリアガス及びカラムメーカーを変更した場合の定量値は500±2%未満であり、ほとんどが±1%以内であった。したがって、これらの測定条件の違いがRMS法による定量値に及ぼす影響は小さいと考えられた。

3.3 装置メーカーの違いによる定量値への影響

装置メーカーの違いによる定量値の影響を確認するため、国立衛研の他に、東京都健康安全研究センター、(公社)日本食品衛生協会、(一財)化学研究評価機構(高分子試験・評価センター 東京事業所及び大阪事業所)、(一財)東京顕微鏡院及び(一財)日本文化用品安全試験所にて実施した(本報告書ではランダムにA~Fと記載した)。その結果を表15に、使用した装置及び操作条件等は表16に示した。

表 9 HSS 加熱温度の違いによる定量値 (μg/g) の違い

加熱温度 (°C)	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
138	503	502	501	499	503	507	506	505	503	508
<u>140</u>	499	499	500	496	501	502	503	504	500	504
142	494	498	500	498	500	497	501	503	501	503
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 10 HSS 加熱時間の違いによる定量値 (μg/g) の違い

加熱時間 (分)	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
58	498	500	501	496	501	501	503	504	499	504
<u>60</u>	499	499	500	496	501	502	503	504	500	504
62	498	499	501	498	501	501	502	503	501	504
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 11 試料量の違いによる定量値 (μg/g) の違い

試料量 (mL)	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
1.8	497	499	500	497	502	497	499	500	497	502
<u>2.0</u>	499	499	500	496	501	502	503	504	500	504
2.2	500	502	503	500	505	500	502	503	500	505
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 12 バイアルサイズの違いによる定量値 (μg/g) の違い

バイアル サイズ (mL)	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
<u>20</u>	496	498	500	499	502	497	499	501	500	503
10	504	498	500	497	498	506	500	503	500	501
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 1 3 キャリヤーガスの違いによる定量値 (μg/g) の違い

キャリヤー ーガス	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
He	500	501	501	500	503	503	503	504	503	506
N ₂	496	498	500	499	502	497	499	501	500	503
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 1 4 カラムメーカーの違いによる定量値 (μg/g) の違い

カラム	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
DB-WAX	496	498	500	499	502	497	499	501	500	503
InertCap Pure-WAX	487	493	494	494	492	491	496	498	498	496
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 1 試行

表 1 5 装置メーカーの違いによる定量値 (μg/g) の違い

機関 (装置メー カー)* ¹	<i>n</i> -デカン					ヘキサン酸メチル				
	TO	EB	IPB	NPB	ST	TO	EB	IPB	NPB	ST
国立衛研	498	499	500	496	501	502	503	504	500	504
(A/A)	(0.1)	(0.0)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.0)	(0.1)	(0.1)	(0.1)
A	502	498	496	492	502	498	495	493	488	499
(A/A)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.1)	(0.2)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.1)	(0.2)
B	529	502	492	488	503	530	503	493	489	504
(S/S)	(0.4)	(0.3)	(0.8)	(2.1)	(0.3)	(0.4)	(0.3)	(0.8)	(2.1)	(0.3)
C	510	496	492	487	496	556	540	536	531	540
(S/S)	(0.1)	(0.1)	(0.3)	(0.3)	(0.0)	(0.1)	(0.1)	(0.3)	(0.3)	(0.0)
D* ²	629	564	488	451	506	615	552	478	441	496
(P/S)										
E	673	601	532	492	553	681	608	538	498	560
(P/S)	(0.9)	(0.6)	(0.9)	(0.3)	(0.5)	(0.9)	(0.6)	(0.9)	(0.3)	(0.5)
F	720	624	531	475	558	788	683	581	520	610
(P/S)	(0.3)	(0.5)	(0.6)	(0.7)	(0.4)	(0.3)	(0.5)	(0.6)	(0.7)	(0.4)
誤差範囲の色分け			< ±2%		< ±5%		< ±10%		≥ ±10%	

数値は 3 試行の平均値 (相対標準偏差%)

*¹A: アジレントテクノロジー社製、S: 島津製作所製、P: パーキンエルマー社製*²1 試行の結果

表 1 6 各機関の装置及び測定条件

機関		国立衛 研	A	B	C	D	E	F
機種	GC	Agilent 8890	Agilent 7890B	島津 GC-2010	島津 GC-2030	島津 GC-2010 Plus	島津 GC-2010	島津 GC-2030
	HSS	Agilent 8697	Agilent 697A	島津 HS-20	島津 HS- 20NX	Perkin Turbo Matrix HS-40	Perkin Turbo Matrix HS-40	Perkin Turbo Matrix HS- 40
カラム		DB-WAX				TC-WAX	DB-WAX	
カラムサイズ		30 m × 0.25 mm、0.5 μm						
HSS 条件	加熱温度 (°C)	140						
	加熱時間 (分)	60						
	ニードル温度 等*1 (°C)	145	145	150	150	145	150	145
	トランスファ ーライン温度 (°C)	155	155	155	150	155	150	145
	注入量	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	0.07 分	1 mL	1 mL
GC 条件	カラム温度	60°C（1 分）→6°C/分→150°C→30°C/分→180°C						
	注入口温度 (°C)	220	220	220	— *2	220	220	220
	スプリット比	25 : 1	25 : 1	100 : 1	25 : 1	25 : 1	25 : 1	10 : 1
	キャリアーガ ス	N ₂	He	N ₂	N ₂	N ₂	He	He
	カラム流量 (mL/min)	1.3	1.4	1.06	1.10	1.01	1.40	1.0

*1 ニードル温度、ループ温度又はサンプルライン温度

*2 サンプルは HS サンプラーから直接 GC のカラムに注入されるため注入口温度の設定項目がない構成

その結果、真値を 500 とした場合の定量値の誤差は-12~57%となった。国立衛研と同じアジレントテクノロジー社製の装置を使用した機関 A では定量値の差はいずれも±2.5%以内であった。一方、HSS と GC がいずれも島津製作所製であった機関 B と機関 C については、機関 B はトルエンの定量値は 6%程度高い値となったが、それ以外は±2.5%以内に収まった。この原因はトルエンのピークに不純物に由来するピークが重複していたためと考えられたが、クロマトグラムからはその様子は確認できなかった。また、機関 C については、基準物質を *n*-デカンとした場合の定量値はいずれも±2.5%以内に収まったが、基準物質をヘキサン酸メチルとした場合の誤差は+6%以上となった。この原因は基準物質のヘキサン酸メチルの面積値が小さかったためと考えられたが、その原因を明らかにすることはできなかった。

一方、機関 D、E 及び F の定量値の誤差は-12~57%と大きかった。これらの機関ではいずれも島津製作所製の GC にパーキンエルマー社製の HSS に接続して使用していた。このように、アジレントテクノロジー及び島津製作所の HSS を使用した結果に対してパーキンエルマーの HSS を使用した結果に大きな違いがあったため、誤差の主な要因は装置の違いであると考えられた。そこでそれぞれの装置の HSS の機構について確認したところ、アジレントテクノロジー及び島津製作所の HSS は、一定体積のサンプルループに HS ガスを充填し、その体積分をトランスファーラインを通過して GC へ導入するループ方式であったが、パーキンエルマーの HSS は、バイアル内を一定圧力まで加圧し、その圧力差により HS ガスを GC へ導入する圧力バランス方式であった。圧力バランス方式の場合、HS バイアルを加熱するだけでなくさら

に圧力が加わるため、単に加熱した場合と比べ各化合物の気化率が変わり、その結果、気相内での濃度差が生じた可能性があった。つまり、本研究において定量値に誤差が生じたのは、HSS による HS ガスの導入方式の違いによると考えられた。また、同一装置である機関 D、E 及び F の結果も大きく異なっていたが、測定時の設定加圧圧力や加圧時間が異なっており（詳細なデータは非公表）、この違いによって気化率に差が生じ、異なる定量値となったと考えられた。一方、これらの条件を統一することで、同等の結果が得られる可能性が示唆された。

3. 4 室内精度の評価

装置メーカーの違いによって定量値が大きく異なることが明らかとなり、共通の RMS 値を設定することは困難であることが明らかとなった。しかし、軽微な条件の変更は定量値に影響がないことが示されたことから、同一装置を用いて自機関内で継続的に測定を行う場合は RMS 法の利用が可能であると期待された。そこで、単一試験所における室内精度を評価した。これまでと同様に材質当たり 500 µg/g の溶液を試料とし、1 週間又は 3 週間の間隔で 1 日 3 試行で測定を行い、得られた定量値から真度を求め、さらに一元配置の分散分析から併行精度(%)及び室内精度(%)を求めた。その結果、真度は 99.5~100.9%、併行精度は 0.2~0.3%、室内精度は 0.3~0.4%となった(表 1 7)。このように、全てのスチレン類において真度は 100±1%以内、精度はいずれも 0.5%未満と非常に良好な結果が得られた。したがって、自機関で一度 RMS 値を決定すれば、以降はその RMS 値を用いた RMS 法による運用が可能であると考えられた。

表 1 7 室内精度の評価結果

基準物質	スチレン類	試行回数	濃度 (μg/g)						真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
			1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	平均値			
<i>n</i> -デカン	TO	1	498	498	498	498	499	498	99.7	0.2	0.3
		2	498	498	498	496	502				
		3	498	498	499	498	499				
	EB	1	499	499	499	500	500	500	100.0	0.2	0.3
		2	499	500	499	499	504				
		3	499	499	499	500	501				
	IPB	1	500	500	500	500	501	501	100.1	0.2	0.3
		2	500	500	499	501	505				
		3	500	500	499	501	503				
	NPB	1	496	496	497	497	499	498	99.5	0.2	0.3
		2	497	498	498	498	501				
		3	496	497	496	499	499				
	ST	1	501	501	502	501	503	502	100.3	0.3	0.4
		2	501	501	501	501	508				
		3	500	501	501	502	502				
ヘキサ ン酸メ チル	TO	1	502	500	500	502	502	501	100.3	0.2	0.3
		2	501	500	500	500	506				
		3	502	500	501	501	502				
	EB	1	503	501	502	503	504	503	100.5	0.2	0.3
		2	503	502	502	502	507				
		3	503	501	502	503	504				
	IPB	1	504	502	503	503	504	504	100.7	0.2	0.4
		2	503	502	502	505	508				
		3	504	502	501	505	506				
	NPB	1	500	499	500	500	502	500	100.1	0.2	0.3
		2	501	500	500	502	504				
		3	500	500	498	502	502				
	ST	1	504	503	504	504	506	505	100.9	0.3	0.4
		2	505	504	504	505	511				
		3	504	503	503	505	505				

D. 結論

HSS を用いた GC-FID 分析における RMS 法の適用可能性について、スチレン類試験法を対象に検討した。適切な基準物質、内標準物質の検討を行い、それらを用いて RMS 値を算出した。さらに RMS 法と通知試験法 2 とを用いて試料中のスチレン類を定量し、それぞれの定量値を比較した。その結果いずれも同等の結果が得られたことから、HSS-GC-FID 分析にも RMS 法を適用可能であることが示された。また、HSS 加熱温度・時間、試料量の数%程度の違いやキャリアーガス等の違いの影響をほとんど受け

ないことが確認された。しかしながら、異なるメーカーの装置を用いた場合、HSS の HS ガスの導入機構の違いにより化合物の気化効率が変わる可能性があり、すなわち、全ての装置メーカーに共通の RMS 値を適用することが困難であることが明らかとなった。一方、室内精度を検証した結果良好な結果が得られたことから、同一装置を用いて自機関内で継続的に測定を行う場合、一度 RMS 値を決定すれば、以降はその RMS 値を用いた RMS 法による運用が可能であると考えられた。

なお、これらの結果を踏まえ、次年度はさら

に長期間にわたる室内精度の評価を複数機関で実施する予定である。

E. 参考文献

1. 器具及び容器包装に関する試験法、消食基第362号別添（令和7年5月30日）
2. 三宅大輔、早川賢治、野村孝一：*o*-ジクロロベンゼンを用いたヘッドスペース・ガスクロマトグラフィーによるスチレン系ポリマー中

の揮発性物質の分析法、食品衛生学雑誌、54、374-379 (2013)

3. Y. Abe, M. Yamaguchi, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Akiyama: Survey of volatile substances in kitchen utensils made from acrylonitrile-butadiene-styrene and acrylonitrile-styrene resin in Japan, Food Science & Nutrition, 2, 236-243 (2014)

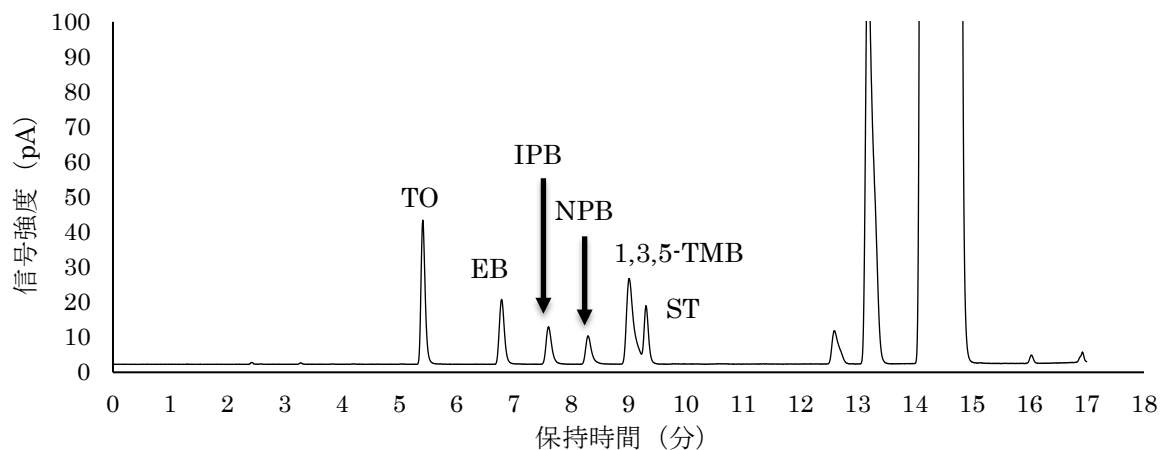


図1 1,3,5-TMB 及び揮発性物質のクロマトグラム

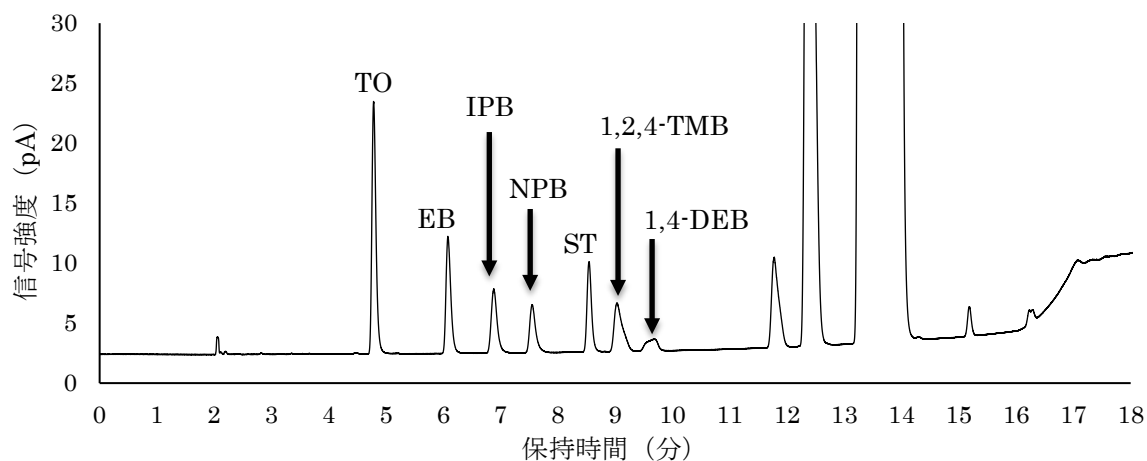


図2 1,4-DEB、1,2,4-TMB 及び揮発性物質のクロマトグラム

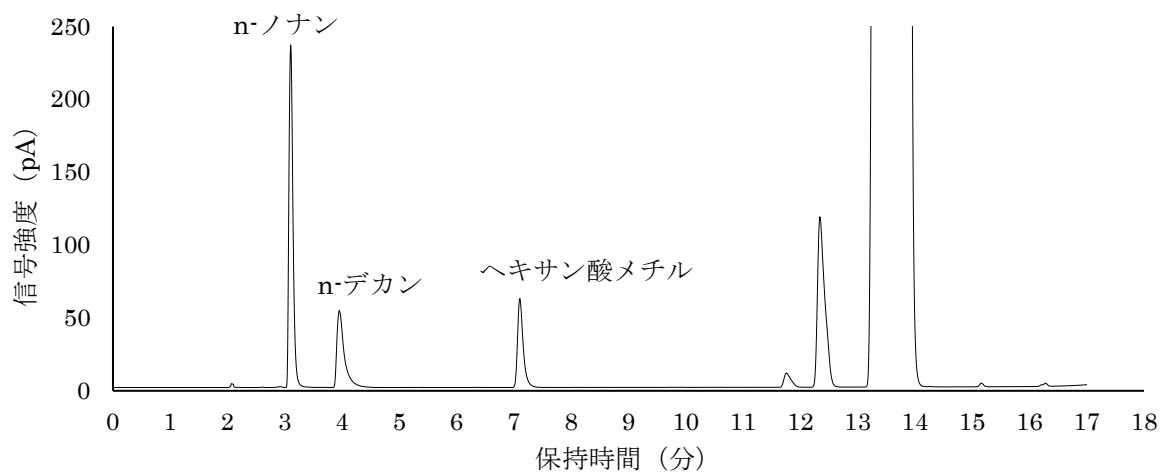


図3 *n*-ノナン、*n*-デカン及びヘキサン酸メチルのクロマトグラム

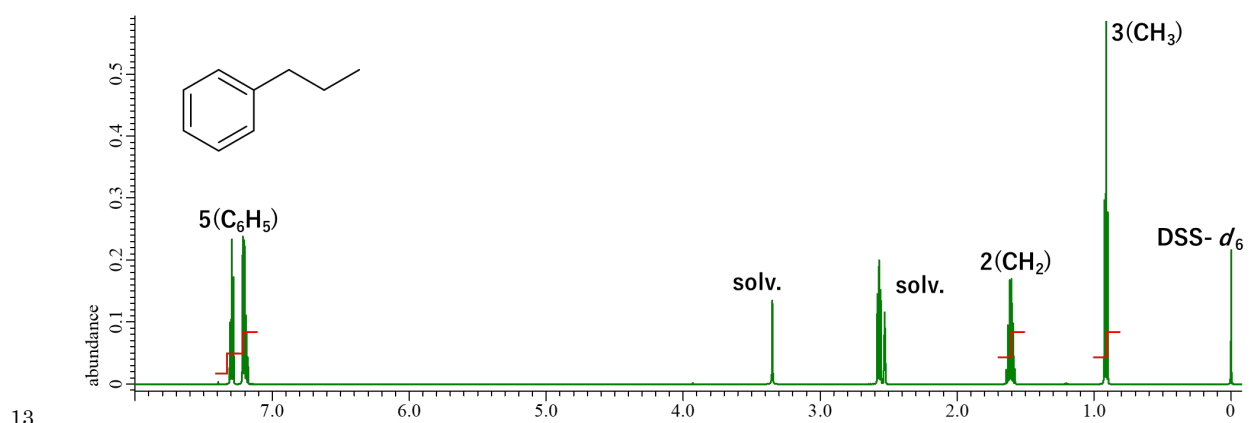
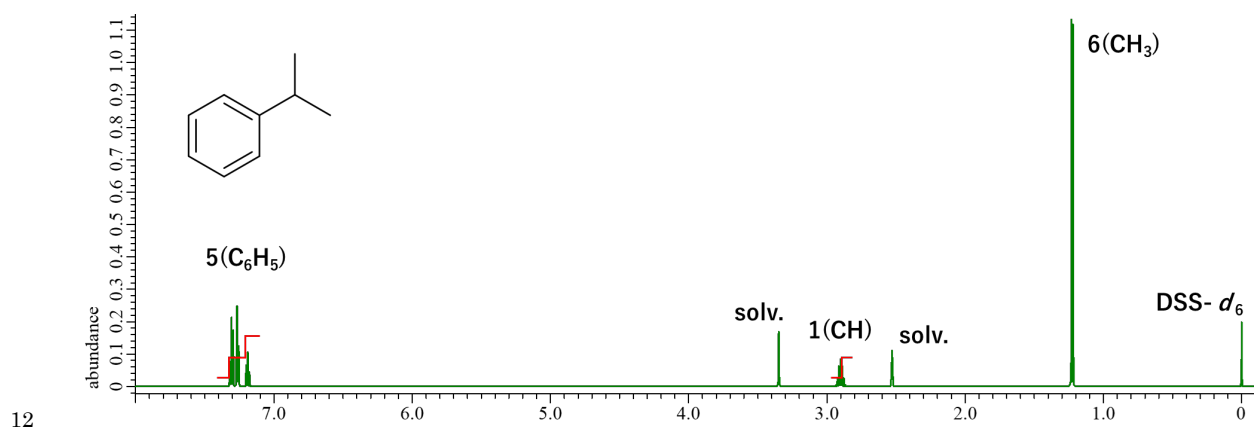
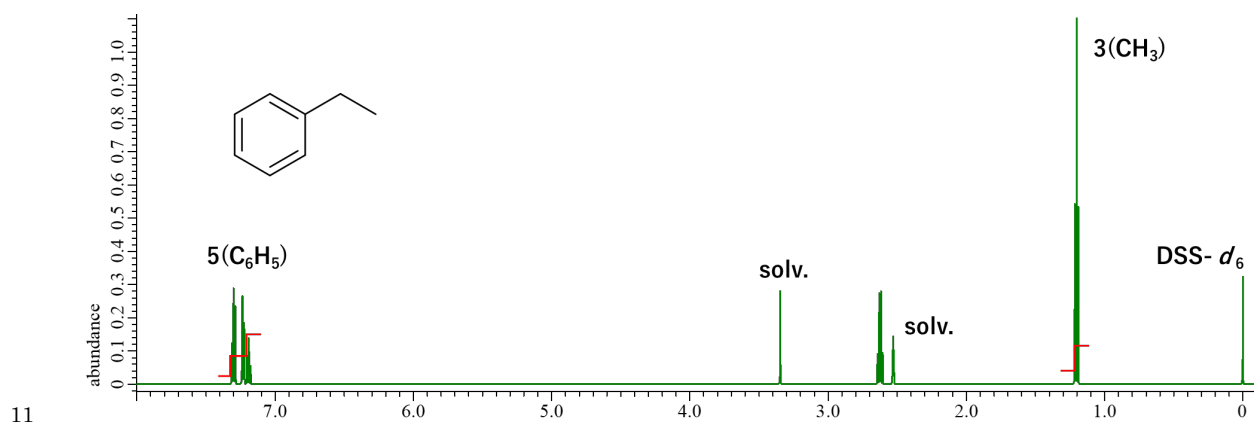
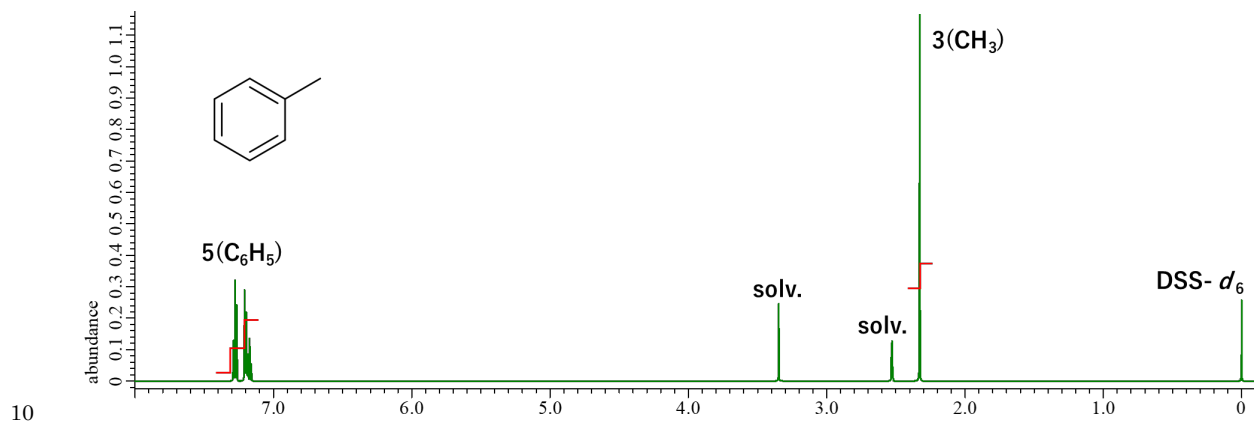


図 4 NMR スペクトル (TO、EB、IPB、NPB)

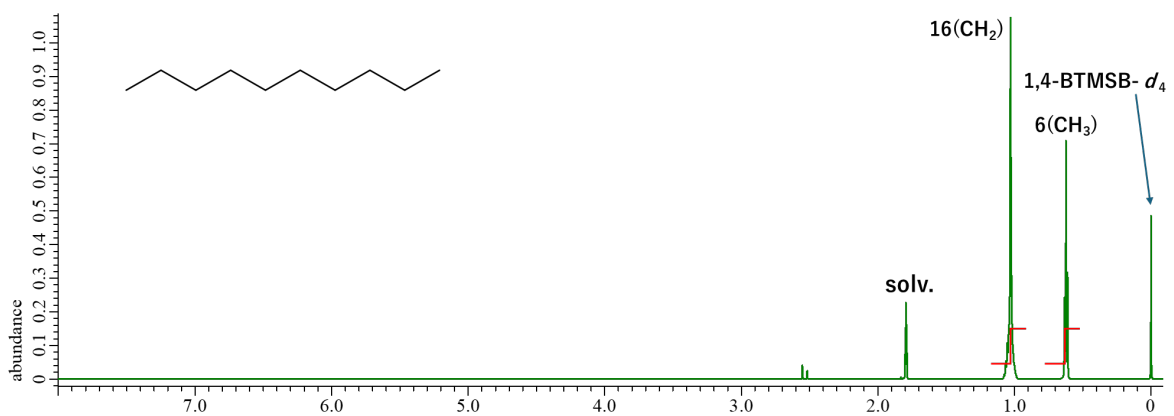
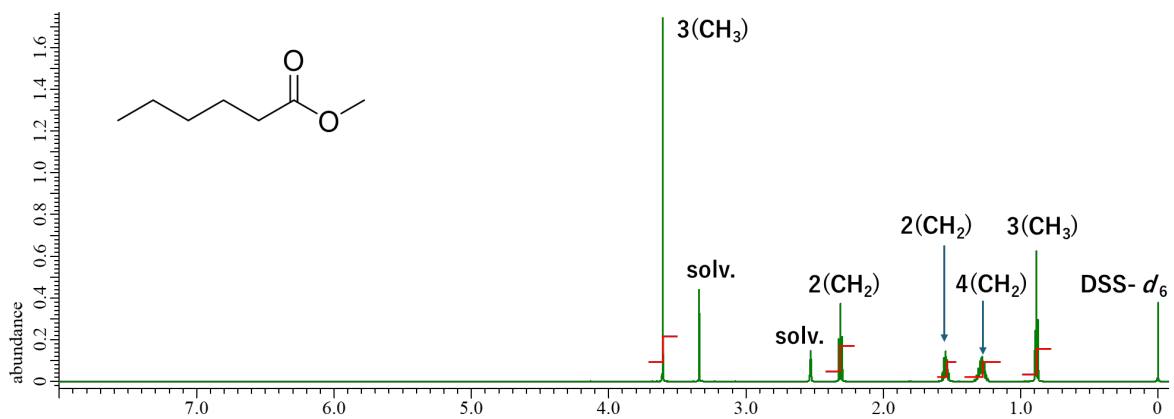
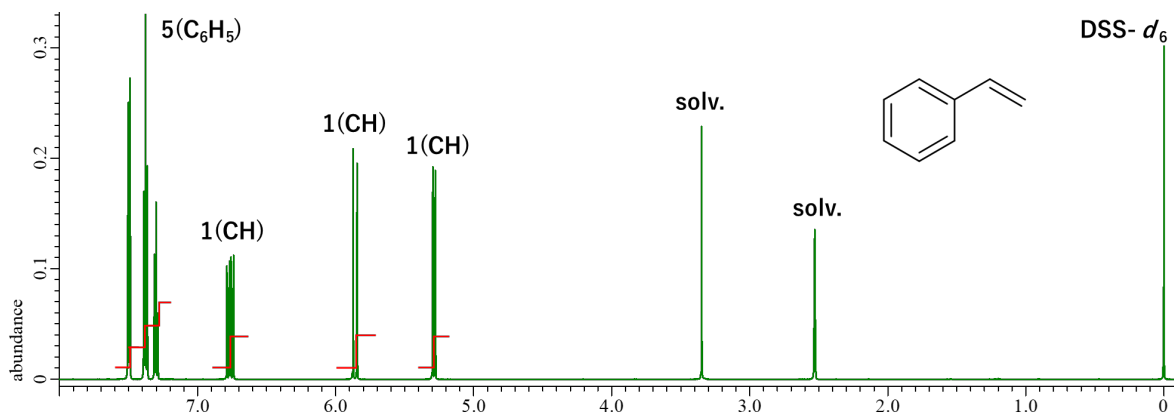


図4 (続き) NMR スペクトル (ST、ヘキサン酸メチル、*n*-デカン)