

平成14年度厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品用器具・容器包装等の 安全性確保に関する研究

総括・分担研究報告書

平成15(2003)年4月

主任研究者	河村 葉子	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	鎌田 国広	東京都立衛生研究所
分担研究者	外海 泰秀	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	高野 忠夫	(財)化学技術戦略推進機構

器具・容器包装の規格試験法の精度向上に関する研究

分担研究者 鎌田 国広 東京都立衛生研究所

研究要旨

食品衛生法の器具・容器包装に関する規格試験法の中には、労働安全衛生法や化審法で規制されている有害試薬を使用しているもの、再現性や回収率等に問題があり精度管理に適合困難なもの、また、現在の科学水準に対応が不十分なものなどがあり、これらの規格試験法の整備が求められている。そこで、今年度はポリ塩化ビニル中のジブチルスズ化合物の材質試験、ポリエチレンテレフタレートのアнтиモン・ゲルマニウムの溶出試験、金属缶のエピクロルヒドリン試験法及びフェノール試験法の精度向上に関する検討を行った。

ジブチルスズ化合物は、ポリ塩化ビニルの安定剤として使用されているが、毒性が高いため食品衛生法ではポリ塩化ビニル中のジブチルスズ化合物は塩化物として 50ppm 以下と定められている。しかし、現在のジブチルスズ化合物試験法は抽出に有害試薬である四塩化炭素を用いているほか、操作が煩雑であり、回収率も悪い。また、検出には分離能が低い紙クロマトグラフィーを用いるなど問題が多い。そこで有害試薬を用いず、簡便で分析精度の優れた試験法の検討を行った。その結果、塩酸を含むアセトン及び *n*-ヘキサンの混液で溶媒抽出し、テトラエチルホウ酸ナトリウムによりエチル化を行った後、GC/MS により定量する代替法を確立した。本法は定量限界 1.0 $\mu\text{g/g}$ 、回収率 90.5~96.6%と極めて良好であり、ばらつきも少なく優れた試験法である。

アンチモン、ゲルマニウムは、ポリエチレンテレフタレート（PET）の縮合触媒として使用されていて、最終製品中にごく微量であるが残留する。それらの毒性のため、食品衛生法では、溶出試験でアンチモン 0.05ppm 以下、ゲルマニウムでは 0.1ppm 以下と定められている。現行の規格試験は吸光度法が用いられているが、アンチモンの回収率が悪く、また、アンチモンでは灰化時間、更にゲルマニウムでは抽出操作に長時間を必要とし、有害試薬である四塩化炭素を使用する等の問題がある。そこで、溶出試験溶液である 4%酢酸溶出液を直接試験溶液としてフレイムレス原子吸光光度計、ICP 及び ICP-MS に供する、煩雑な操作を必要としない、高感度、高精度の試験法を検討した。その結果、試料溶液及びアンチモン、ゲルマニウム標準溶液は、フレイムレス原子吸光光度計、ICP、ICP-MS で干渉作用の影響を受けず、精度良く分析することができた。また、市販の PET 容器を使用してアンチモン、ゲルマニウムの溶出試験の添加回収実験を行った結果、回収率、相対標準偏差も良好な結果が得られた。本法は、簡便、迅速で有害試薬を用いない安全な分析法で、且つ高精度に試料溶液中のアンチモン、ゲルマニウムを分析する有用な試験法である。

エピクロロヒドリンは、金属缶の内面塗装剤として用いられるエポキシ樹脂の原料で樹脂中に残存する可能性がある。毒性が高いため食品衛生法では、溶出試験で 0.5ppm 以下と定められている。しかし、現行のエピクロロヒドリン試験法はパックドカラムによるガスクロマトグラフィー法が規定されており、検出感度が 2~3ppm と悪く、通常の試験溶液を満たす調製法では基準値付近の測定を行うことが不可能である。これを補うために公定法では変則的な浸出条件が採用されているが、恒温器の温度管理や *n*-ペンタンの揮散などの実務分析上の問題点を抱えている。そこで、高感度分析法の確立を目的としてキャピラリーカラムによるガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析を用いる試験法について検討した。その結果、変則的な試験溶液の調製法を行うことなく、基準値の 1/10 以下 (0.05ppm) を容易に精度良く測定することが可能となった。

器具及び容器包装の規格基準におけるフェノール試験法は、対象とする試料によって 4-アミノアンチピリン法と臭素溶液による方法 (トリブロモ法) が規定されている。しかし、トリブロモ法は感度が悪く、劇物である臭素を用いる等の問題がある。そこで、トリブロモ法が適用されているものについて 4-アミノアンチピリン法が適用できるか検討を行った。4-アミノアンチピリン法による添加回収試験 (5 及び 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を行った結果、平均回収率は 101~109% と良好であった。このことよりトリブロモ法を 4-アミノアンチピリン法に代替して問題ないと考えられる。また、4-アミノアンチピリン法に記載されているホウ酸緩衝液が溶解しにくいことから、適切な緩衝液の濃度について検討した。その結果、第 1 液、2 液とも 0.1M にし、等量混合した緩衝液を用いて良好に測定することができた。

研究協力者

河村 葉子	国立医薬品食品衛生研究所	藤田 忠雄	大阪市立環境科学研究所
六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所	山口 之彦	大阪市立環境科学研究所
大野 浩之	名古屋市衛生研究所	尾崎 麻子	大阪市立環境科学研究所
鈴木 昌子	名古屋市衛生研究所	金子 令子	東京都立衛生研究所
池辺 克彦	大阪府立公衆衛生研究所	船山 恵市	東京都立衛生研究所
柿本 幸子	大阪府立公衆衛生研究所	羽石奈穂子	東京都立衛生研究所

＜その1＞ポリ塩化ビニル材質試験におけるジブチルスズ化合物試験法の代替法の開発

主任研究者 河村葉子 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 六鹿元雄 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 鈴木昌子 名古屋市衛生研究所

A. 研究目的

有機スズ化合物は、器具・容器包装の分野ではポリ塩化ビニルの安定剤やシリコーン樹脂の縮合触媒等に使用されている。安定剤の中では特に透明性に優れていることから、主として加工温度の高い透明な硬質ポリ塩化ビニルに使用される。そのうち、ジブチルスズ化合物は農業用ビニル等の食品用途以外のポリ塩化ビニルに使用されているが、哺乳類に対して中枢神経障害、代謝障害、胸腺萎縮等を生じ、毒性が高い。そのため、食品用器具・容器包装に使用することは望ましくないことから、食品衛生法ではポリ塩化ビニル中のジブチルスズ化合物を塩化物として 50 ppm 以下と定めている。このため、食品用器具・容器包装にはジブチルスズ化合物が使用され、一方、水道管には主にジメチルスズ化合物が使用されるようになった。

現行の食品衛生法の「食品、添加物等の規格基準」における試験法では、ジブチルスズ化合物をメタノール・四塩化炭素を用いて抽出し、蒸発乾固した後、メタノールに再溶解し、ろ紙クロマトグラフィーにより検出を行うとされている。

しかし、この方法にはいくつかの問題点が指摘されている。抽出に用いる四塩化炭素は「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」の中で第二種特定化学物質に指定されている有害試験薬であり、しかも今後は入手が困難になる可能性があり、試験検査から排除する必要があるとされている。食

品添加物等の試験では大部分が改正され、使用されなくなっている。さらに、抽出操作が煩雑であるため回収率や再現性に問題がある。また、ろ紙クロマトグラフィーは分離能が十分ではなく、他の試験法ではガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー等に切り替えられている。そのため、ジブチルスズ化合物試験法において、四塩化炭素を使用せず、しかも精度の高い試験法の開発が緊急の課題となっていた。

ポリ塩化ビニル中のジブチルスズ化合物試験法について、著者らは塩酸酸性下で溶媒抽出を行い、グリニャール試薬によりプロピル化し GC-AED で測定する方法¹⁾、TLC による分析法²⁾ 及びテトラエチルホウ酸ナトリウムによりエチル化し GC/MS で測定する方法³⁾ を報告してきた。そこで、それらの報告に新たな実験を加え、ジブチルスズ化合物試験法の比較検討を行い、現行の規格試験法の代替法として確立したので報告する。また、同時に他のアルキルスズ化合物についても検討したのであわせて報告する。

B. 研究方法

1. 試料

ポリ塩化ビニルパウダー（無添加）

ポリ塩化ビニル製品：ラップフィルム 2 検体、手袋 2 検体、容器（包装済み食品の容器及び食品用として販売されていた空容器）3 検体、急須注ぎ口 1 検体、ホース（家庭用）1 検体、パイプ 3 検体（耐衝撃

性水道用硬質管 2 検体及び給湯用耐熱性硬質管 1 検体)

2. 試薬

(1) 溶媒等

n-ヘキサン、アセトン：残留農薬分析用 シグマアルドリッチジャパン(株)製等、塩酸及び酢酸：精密分析用 片山化学工業(株)製等、2-プロパノール：HPLC 用 片山化学工業(株)製等、テトラヒドロフラン (THF)：HPLC 用 和光純薬工業(株)製等、エーテル及び無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 和光純薬工業(株)製等、水：MILLI-Q SP (Millipore 社製) により精製した超純水または同等品

(2) 標準品

塩化モノメチルスズ (MMT)：Aldrich 社製、塩化ジメチルスズ (DMT)：東京化成工業(株)製又は Aldrich 社製、塩化トリメチルスズ (TMT)：東京化成工業(株)製又は Aldrich 社製、塩化モノブチルスズ (MBT)：関東化学製又は Aldrich 社製、塩化ジブチルスズ (DBT)：東京化成工業(株)製、塩化トリブチルスズ (TBT)：東京化成工業(株)製又は Aldrich 社製、塩化ジオクチルスズ (DOT)：東京ファインケミカル製又は Lancaster 社製、塩化トリオクチルスズ (TOT)：日東化成(株)製又は Fluka Chemie 社製

(3) 標準溶液

有機スズ標準原液：標準品各 40 mg にアセトン及び塩酸 2～3 滴を加えて溶解した後アセトンで 20 ml とした (塩化物として 2,000 µg/ml)。

モノオクチルスズ (MOT) 標準原液：モノオクチルスズオキサイド (和光純薬工業(株)製) 31.3 mg をアセトン約 15 ml 及び塩酸 1 滴を加えて溶解させた後、アセトンで 20 ml とした (塩化物として 2,000 µg/ml)。

有機スズ混合標準溶液：各標準原液を一定量ずつ採り、塩酸 2～3 滴を加え、アセトン

で適宜希釈混合して 2～100 µg/ml の標準溶液を調製した。TLC 用には DBT と DOT を混合して 50 µg/ml 及び 100 µg/ml の標準溶液を調製した。

内部標準液：テトラブチルスズ (TeBT) (東京化成(株)製) 100 mg を *n*-ヘキサンに溶解し 100 ml とした後、この溶液 1 ml を取り *n*-ヘキサンで希釈して 100 ml とした (10 µg/ml)。

(4) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層板：シリカゲル 60 (Merck 社製)

展開溶媒：*n*-ヘキサン-酢酸 (8:1)、*n*-ヘキサン-2-プロパノール-酢酸 (7:3:0.1)、アセトン-酢酸 (100:1)

発色試薬 ① 0.5%ヘマトキシリン-エタノール溶液：ヘマトキシリン (SIGMA 社製) 500 mg をエタノールで溶解し 100 ml とした。② 0.1%ピロカテコールバイオレット-エタノール溶液：ピロカテコールバイオレット (Aldrich 社製) 100 mg をエタノールで溶解し 100 ml とした。

(5) ガスクロマトグラフィー

① グリニャール反応によるプロピル化

n-プロピルマグネシウムブロミド：東京化成工業(株)製

亜硫酸ナトリウム、塩酸：試薬特級、和光純薬工業(株)製

② テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化

2%テトラエチルホウ酸ナトリウム溶液：テトラエチルホウ酸ナトリウム (Strem Chemicals 社製又は和光純薬工業(株)製) 0.4 g を精製水 20 ml に溶かして 2%水溶液とし、調製後直ちに使用した。

酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 約 5.0)：2 mol/l 酢酸と 2 mol/l 酢酸ナトリウムを 3:7 の割合で混合して調製した。

3. 装置

原子発光検出器付ガスクロマトグラフ (GC/AED) : ガスクロマトグラフ HP-5890 SERIES II、原子発光検出器 HP-5291A 以上 Hewlett Packard 社製

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) : ガスクロマトグラフ HP-6890、質量分析計 HP-5973 以上 Hewlett Packard 社製

炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FPD) : ガスクロマトグラフ GC-9A、データ処理装置 C-R7A plus 以上 島津製作所製

4. ガスクロマトグラフ測定条件

(1) GC/AED

カラム : キャピラリーカラム DB-5 (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m) J&W 社製

カラム温度 : 35 $^{\circ}$ C (2 min) - 30 $^{\circ}$ C/min - 200 $^{\circ}$ C - 15 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C (4 min)

注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C

キャビティ温度 : 280 $^{\circ}$ C

キャビティ圧 : 1.5 psi

キャリアガス : He、173 kPa (定圧)

測定波長 : 303.3 nm、注入量 : 1 μ l

(2) GC/MS

カラム : キャピラリーカラム DB-5 (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m) J&W Scientific 社製又は HP-5 ms (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m) Hewlett Packard 社製

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

注入口温度 : 290 $^{\circ}$ C

インレット温度 : 280 $^{\circ}$ C

イオン源温度 : 230 $^{\circ}$ C

キャリアガス : He、0.5 ml/min

注入量 : 1 μ l

注入モード : スプリットレス

イオン化電圧 : 70 eV

測定モード : SIM

定量イオン : 表 1 に示す定量イオンにより定量した。

(3) GC-FPD 測定条件

カラム : キャピラリーカラム DB-5 (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m) J&W Scientific 社製

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

注入口温度 : 280 $^{\circ}$ C

キャリアガス : He、0.5 ml/min

スプリット比 : 3 : 2

検出器温度 : 280 $^{\circ}$ C

フィルター : スズ (610 nm)

Air : 100 ml/min、H₂ : 100 ml/min

注入量 : 5 μ l

5. アルキル化法

(1) グリニャール試薬によるプロピル化

有機スズを含有する 20 ml のエーテル溶液に *n*-プロピルマグネシウムブロミド 2 ml を徐々に加えた後、密栓して 37 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。氷冷下で冷水 10 ml を少しずつ加えた後に緩やかに振り混ぜ、亜硫酸ナトリウム 0.2 g、飽和塩化アンモニウム溶液 6 ml を加えて密栓し、激しく振とうした。*n*-ヘキサン 6 ml で 2 回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。

(2) テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化

酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 5 ml と内部標準液 0.25 ml を入れた試験管に、有機スズを含有するヘキサン溶液 2 ml 及び 2% テトラエチルホウ酸ナトリウム 1 ml を加え、直ちに密栓し 20 分間激しく振とうした後、室温で約 1 時間静置した。

6. TLC 法

薄層板上に、試験溶液及びジブチルスズ標準溶液 5 μ l をそれぞれスポットし、展開溶媒を加えた展開槽に入れた。約 10 cm 展開させた後薄層板を取り出し、十分風乾させた後、発色試薬を噴霧した。試料、DBT 標準溶液及び DOT 標準溶液のスポットの R_f 値を比較し判定した。

7. 試験溶液の調製法

(1) 抽出液

①アセトン-*n*-ヘキサン抽出法

細切又は粉碎した試料 0.5 g、1 g 又は 2 g を共栓フラスコにとり、アセトン-*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 20 ml (1 g の場合は 40 ml、2 g の場合は 50 ml) 及び塩酸 1~2 滴を加え、密栓して約 40 °C で一晩浸漬した後ろ過し、ろ液と洗液をあわせて抽出液とした。

②テトラヒドロフランによる溶解法

試料 1 g を精ひょうして三角フラスコに入れ、テトラヒドロフラン 30 ml 及び塩酸 1~2 滴を加え溶解した後、*n*-ヘキサン 100 ml を徐々に滴下して樹脂を析出させた。ろ過後、ろ液を抽出液とした。

(2) 試験溶液

① TLC 法

試料 2 g から得られた抽出液を 1 ml 弱まで減圧濃縮 (40 °C 以下) した後、アセトンを加えて 1.0 ml としたものを試験溶液とし、TLC で測定した。

②グリニャール試薬によるプロピル化法

試料 1 g から得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後約 1 ml に減圧濃縮 (40 °C 以下) し、スクリュウキャップ付試験管に移して、エーテルを加え 20 ml とした。グリニャール試薬によるプロピル化を行った後、*n*-ヘキサンで 100 ml に定容した。その一部をフィルターろ過して亜硫酸ナトリウム約 0.05 g を加え試験溶液とし、GC/AED で測定した。

③テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化法

試料 0.5 g から得られた抽出液をナス型フラスコに採り、約 1 ml になるまで減圧濃縮 (40 °C 以下) した。目盛り付き遠沈管に移し、*n*-ヘキサンを加えて 20 ml とした後、遠心分離 (約 900 \times g、10 分) を行った。得られた上清 2 ml を用いてテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化を行った後、*n*-ヘキサン層を採った。これを試験溶液とし、GC/MS 及び GC-FPD で測定した。有機スズ化合物を高濃度含有する場合は、上清を適宜 *n*-ヘキサンで希釈し、再度エチル化を行い試験溶液を調製した。

8. 添加回収試験

(1) TLC 法

ポリ塩化ビニルパウダー及び細切したポリ塩化ビニル製手袋、ラップフィルムそれぞれ 2 g を精ひょうし、DBT 及び DOT 標準溶液を 25 μ g/g 及び 50 μ g/g となるように添加し、30 分放置後、本法に従い試験操作を行った。

(2) ガスクロマトグラフィー法

グリニャール試薬によるプロピル化法ではポリ塩化ビニルパウダー、テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化法ではポリ塩化ビニルパウダー及び細切したポリ塩化ビニル製手袋、ラップフィルムを 0.5 g 精ひょうし、有機スズ化合物を 10 μ g/g 及び 100 μ g/g となるように添加して、30 分放置後、各方法に従い試験操作を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 抽出法の検討

ポリ塩化ビニル中の有機スズ化合物の抽出法として、食品衛生法では四塩化炭素を含む溶媒で 4 時間の還流抽出を行っているが、有害試薬を使用しており、また操作が極めて煩

雑で回収率にも問題がある。一方、衛生試験法⁴⁾及び塩ビ食品衛生協議会自主基準⁵⁾等では、テトラヒドロフランによりポリ塩化ビニルを溶解した後 *n*-ヘキサンを滴下してポリマーを析出させて除去する溶解法が用いられている。また、我々はポリマーから溶媒抽出により目的成分を抽出する方法を用いて、ポリ塩化ビニル中の各種添加剤の分析を行ってきた。そこで、テトラヒドロフランによる溶解法⁶⁾とアセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液による抽出法について、有機スズ化合物を含有する試料を用いて抽出量及び操作法を比較検討した。

抽出を行うに際し、プラスチックに添加される有機スズ化合物は、ジアルキルスズの各種誘導体であるが、酸性下では結合が切れて遊離のアルキルスズになること及び遊離のアルキルスズはガラス等に極めて吸着されやすいが酸性下では吸着が抑制されることから、塩酸酸性下で抽出を行うこととした。抽出時に 4 mol/l 塩酸 2 ml または塩酸 2 滴を添加したところ、水分の混入が少ない後の方が抽出液の脱水が容易であり、また抽出率も良好であったことから抽出時には塩酸を数滴添加することとした。

表 2 に示すように、DBT の抽出量は溶解法と抽出法でほぼ同程度で、やや抽出法の方が高かった。その他の化合物も抽出法の方が高いものが多く、特に分子量の大きい DOT や TOT では抽出法の方が 1.5 倍程度高かった。これは溶解法において分子量の大きい化合物が *n*-ヘキサン添加により析出したポリマーに取り込まれて沈殿し、抽出量が低下したものと推定された。また、抽出法の方が操作もはるかに簡便であることから、アセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液による抽出法を用いることとした。

次に抽出法における抽出回数と抽出効率について比較検討した³⁾。試料にはポリ塩化ビ

ニル製の食品用容器 3 検体、急須の注ぎ口及びホース各 1 検体、これらに比べて材質が極めて硬い水道用及び給湯用の硬質パイプ 3 検体を用いた。このうち、容器は急須の注ぎ口は DBT の含有が確認されたものであり、また、容器は MMT、DMT、MOT、DOT 及び TOT、硬質パイプは MBT、MOT、DOT 及び TOT の含有が確認されたものを使用した。DBT は 1 回目で 94%以上が抽出され、1 回の抽出操作で十分抽出できた。また、MMT、DMT、DOT 及び TOT も 1 回目ではほぼ全量が抽出されたが、MBT と MOT については、硬質の食品用容器及びパイプにおける抽出率が 70.8 ~ 80.9%と若干低い値を示し、材質の硬さが抽出率低下の原因と考えられた。そこで硬質で厚手の製品については粉末状に粉碎することとした。

また、抽出液を減圧濃縮後 *n*-ヘキサンに溶解すると、溶存していたポリマーの析出や懸濁が観察された。この簡易な除去方法として遠心分離を行ったところ、GC/MS 分析における注入口及びカラムの汚染を著しく軽減することができた。

2. TLC 法による測定

展開溶媒は文献^{2,5,7)}等から *n*-ヘキサン-酢酸 (8:1) (A 液)、*n*-ヘキサン-2-プロパノール-酢酸 (7:3:0.1) (B 液)、アセトン-酢酸 (100:1) (C 液) の 3 種類を用い、DBT 及び DOT 標準溶液と添加回収試験溶液について、感度及び分離を比較検討した (表 3)。その結果、標準溶液においては B 液で展開したものが発色強度が強く、DBT (R_f : 0.44) と DOT (R_f : 0.72) の R_f 値の差も大きかった。しかし、試料によっては含有される大量の可塑剤の影響を受け、 R_f 値が変動して標準溶液と一致しなかった。これは C 液でさらに顕著であった。一方、A 液で展開したものはスポットのまとまりが極めてよく、

しかも可塑剤の影響を全く受けなかった。DBT (R_f : 0.29) と DOT (R_f : 0.34) の R_f 値の差が小さかったが、スポットのまとまりがよいため DBT と DOT の判別は十分可能であった (図 1)。

発色試薬については 0.5%ヘマトキシリン-エタノール溶液と 0.1%ピロカテコールバイオレット-エタノール溶液を比較検討した。前者により有機スズ化合物は薄い青色の背景の中に赤みがかった青色のスポットを呈し、後者ではややまだらな黄褐色の背景の中に空色のスポットを呈した。背景とスポットの色彩の関係からヘマトキシリンで発色させた方がスポットを確認しやすかったが、両者の検出感度はほぼ同等であった。

一方、発色試薬噴霧の際、薄層板に酢酸が残っていると発色が不安定になるため、ドライヤー等で十分に揮散させる必要があった。

以上の結果から、展開溶媒として *n*-ヘキサナー酢酸 (8:1)、発色試薬には 0.5%ヘマトキシリン-エタノール溶液の組み合わせが最適と考えられた。この条件で標準溶液及び添加回収溶液を展開したところ、検出限界は試験溶液として 50 $\mu\text{g/ml}$ 、試料の材質あたり 25 $\mu\text{g/g}$ であり、食品衛生法で定める規格値の 50 $\mu\text{g/g}$ を超えているか否かは十分に判別可能であった。

しかし、TLC 法では定量や確認が不十分であることから、スクリーニング法としては適当であるが、規格試験法としては、ガスクロマトグラフィー法の方が優れていると考えられた。

3. ガスクロマトグラフィー法による測定

誘導体化してできたテトラアルキルスズのガスクロマトグラフィーによる測定法として、GC/AED、GC/MS、GC-FPD の 3 種類を比較検討した (図 2~5、表 4)。

(1) GC/AED による測定

GC/AED はマイクロ波で誘導したプラズマ発光を各元素固有の波長で測定する方法で、有機スズ化合物の分析については特に選択性が高く、極めて高分解能で高感度である。鈴木らの方法⁸⁾に準じて GC/AED の測定条件を設定し、9 種類の有機スズのグリニャール反応によるプロピル化標準溶液を測定した。図 2 に示すように、9 種類いずれもプロピル化体のピーク形状は極めてシャープで、良好な分離を示した。標準溶液による検出感度は、トリ体でやや低いが、すべての化合物で 1 ng/ml まで定量可能であり、極めて高感度であった。また、いずれの検量線も、1 ~ 1,000 ng/ml と広範囲にわたり良好な直線性を示した。

GC/AED は有機スズ化合物に対して極めて高感度であることから、材質試験では希釈をして最終液量を 100 ml とした。この場合の試料当たりの定量限界は、9 種類の有機スズすべてで 1.0 $\mu\text{g/g}$ であった。測定に際しては試験溶液を必要に応じてさらに希釈して測定した。

(2) GC/MS による測定

表 1 に示した定量イオンを用いて、9 種類の有機スズ化合物のテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化標準溶液を測定した。GC/MS 測定の定量イオンは、夾雑成分の妨害を軽減するため、できる限り高質量域のイオンを用い、同時に 2 個のイオンを確認用として測定した。内部標準物質には規制対象物質の DBT や、検出頻度の高い MOT 及び DOT のピークに比較的近い位置に出現し、また環境中にほとんど存在しない TeBT を選んだ。

図 3 に示したように、9 種のエチル誘導体及び TeBT はすべて良好に分離し、標準溶液における DBT の定量限界は 10 ng/ml であり GC/AED に次いで高感度であった。最終の試験溶液量が少ないため、試料中の定量限界は

いずれの化合物とも塩化物換算で 1.0 $\mu\text{g/g}$ であり GC/AED と同様であった。メチルスズ化合物のピークが若干テーリングしたが、定量に支障はなかった。各誘導体の検量線は試料中の含有濃度として 10 ~ 5,000 ng/ml の広い範囲で良好な直線性を示した。ただし、5,000 ng/ml を超えると直線性が得られないので、高濃度検出された場合は上清を適宜希釈して再度アルキル化を行い定量する必要がある。食品用容器中の DOT では数十倍の希釈が必要な場合も見られた。また、GC/MS では SCAN モード測定により得られたマススペクトル (図 4) により化合物の確認も可能である。

(3) GC-FPD による測定

GC-FPD にスズフィルターを装着したものはアルキル化した有機リンの測定法として最もよく使われている。GC/MS と同じ 9 種のエチル誘導体及び TeBT を GC-FPD により測定したところ、すべて良好に分離したが (図 5)、GC/MS に比べ感度が悪く、5 μl と 5 倍量を注入しても DBT の標準溶液における定量限界は 100 ng / ml であった。そのため、試料中の定量限界は塩化物換算で 10 $\mu\text{g/g}$ であった。検量線は測定溶液中の含有濃度として 100 ~ 500 ng/ml の範囲で直線性が確認できたが、GC/AED や GC/MS と比べて直線範囲は狭く、定量時にはこの範囲内に試験溶液を調製する必要があり煩雑であった。

(4) ガスクロマトグラフィー法の比較

表 4 に示すように定量限界はそれぞれ GC/AED が 1.0 ng/ml、GC/MS が 10 ng/ml、GC-FPD が 100 ng/ml であり、3 種類の検出器のいずれも DBT の規格値である 50 $\mu\text{g/g}$ を定量するには十分な感度であった。標準溶液において最も定量感度が良く、かつ選択性が良かったのは GC/AED であるが、測定機器としてあまり普及していない。また、GC-FPD は検量線の直線範囲が狭い。そこで

普及率が高く、SCAN モードにより検出されたピークの確認も可能である GC/MS が測定方法として最も適当と考えられた。

4. アルキル化反応

モノ、ジ及びトリアルキルスズ化合物は、ガスクロマトグラフィー測定時にカラムに吸着しやすいことから、テトラアルキルスズとした後定量する方法が一般的である。そこでアルキル化反応として最も一般的なグリニャール試薬によるプロピル化と最近用いられるようになったテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化について比較検討した。

(1) グリニャール試薬によるプロピル化

グリニャール試薬による誘導体化は最も一般的なアルキル化反応であり、試薬も安価で入手しやすい。グリニャール反応によるアルキル化としては、一般にメチル化からペンチル化が行われるが、メチル化及びブチル化では安定剤として使用されるメチルスズ化合物やブチルスズ化合物のアルキル基と識別できないことから、エチル化、プロピル化又はペンチル化が適当である。しかし、エチル化は反応が速いが暴走が起こりやすく、ペンチル化は反応が極めて緩やかだが加熱等により反応を促進させる必要がある。そこで反応が緩やかでしかも室温程度で反応が進むプロピル化を行うこととした。

(2) テトラエチルホウ酸ナトリウムによる

エチル化

テトラエチルホウ酸ナトリウムを用いたエチル化法は、近年、水質、底質及び生物試料中の有機スズのアルキル化法として用いられるようになった方法である。そこでポリ塩化ビニル中の有機スズのエチル化反応条件の検討を行った。

酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液の pH、テトラエチルホウ酸ナトリウムの添加量及び反応時間を種々変化させて検討した。緩衝液の

pH を 3.6 ~ 5.6 に調整して反応させたところ、各有機スズ化合物のテトラブチルスズに対するピーク面積比はいずれも同じような傾向を示し pH4.0 以下では低く、pH4.6 ~ 5.6 ではほぼ一定となった。そこで pH5.0 の緩衝液を用いることとした。

次に 2%テトラエチルホウ酸ナトリウムの添加量を 0.2 ~ 2 ml に変化して反応させたところ、0.2 ml では TOT のピーク面積比が小さくなる傾向を示したが、0.5 ml 以上ではすべてのピーク面積比が平衡に達した。また、反応時間も 5 ~ 60 分間で変化させたところ、10 分以上ですべての化合物が一定となり、特に大きな差は認められなかった。そこで、2%テトラエチルホウ酸ナトリウムの添加量を 1 ml、反応時間を 20 分とした。

また、得られた誘導体は冷蔵庫内保存で 5 日目まですべて安定であったが、それ以降、メチルスズ化合物は減少傾向を示した。

(3) アルキル化反応の比較

グリニヤール試薬によるプロピル化とテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化をポリ塩化ビニル粉末を用いた 7 種類のアルキルスズ化合物の添加回収試験により比較検討した (表 5)。

グリニヤール試薬によるアルキル化では DBT の回収率は 10 $\mu\text{g/g}$ 添加で 77.1%、100 $\mu\text{g/g}$ 添加で 90.3% とほぼ良好であった。また、TBT、DOT 及び TOT も 62.0 ~ 92.3% とほぼ良好な結果であった。しかし、分子量の小さい DMT、TMT 及び MBT では 46.0 ~ 66.8% と低かった。一方、テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化では、7 種類のアルキルスズ化合物すべてで 85.1 ~ 107.7% と極めて良好な回収率が得られた。

このようにグリニヤール法で低分子アルキルスズ化合物の回収率が低いのは、アルキル化の工程が長いことガラス器具等に吸着が起こりやすく、また、加温時や試薬除去時のバ

ブリング等により揮散が生じるためと考えられる。また、反応操作もテトラエチルホウ酸ナトリウムの方がはるかに簡便であった。

以上のことから、アルキル化法としてはテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化が適当と考えられた。

5. 添加回収試験

以上の結果からポリ塩化ビニル中の DBT 及びその他のアルキルスズ化合物の分析法として、アセトン - *n*-ヘキサン (3 : 7) 混液により抽出を行い、テトラエチルホウ酸ナトリウムによりエチル化した後 GC/MS を用いて測定を行うという分析法を構築した。

そこでこの分析法を機関 A 及び B の 2ヶ所において添加回収試験を行った。機関 A では 9 化合物、機関 B では 5 化合物を対象とした。その結果、表 6 に示すように機関 A では DBT は 96.6 ~ 99.4% と極めて良好な回収率が得られ、MMT を除く 7 化合物についても 75.8 ~ 118.1% と良好な回収率であった。ただし、MMT についてはきょう雑物が多量に含まれるラップフィルム及び手袋で 49.1 ~ 63.3% とやや低かった。一方機関 B では 72.0 ~ 112.5% と機関 A より低いもののほぼ良好な回収率であった。機関 A ではこの方法の開発を行い分析に熟知していたのに対し、機関 B ではこの分析法をはじめに行ったがほぼ良好な結果が得られたことから、本法は多くの人が行う規格試験法として適当であることが示された。

また、以上の試験法検討に際しては内部標準を用いて定量を行ったが、DBT については GC/MS による測定値の変動が小さく、規格値の濃度も高いことから、絶対検量線でも十分に定量可能であった。

D. 結 論

現在のジブチルスズ化合物試験法は、抽出

に有害試薬である四塩化炭素を用いているほか、抽出溶媒を酸性にしていなかったため回収率が十分でなく、測定は分離能が低い紙クロマトグラフィーを用いる等問題が多い。そこで四塩化炭素を用いず、しかも分析精度の優れた方法を検討した。

その結果、ポリ塩化ビニルを塩酸酸性下、アセトン-*n*-ヘキサン(3:7)混液で抽出を行い、テトラエチルホウ酸ナトリウムでエチル化し、GC/MSで測定する試験法を確立した。本法はDBTの回収率が84.0~99.4%と極めて良好であり、その他に8種類のアルキルスズ化合物も同時に測定可能である。また定量限界も1.0 µg/gと高感度であり、検出された化合物をGC/MSのスペクトルにより確認することができる。しかも、操作が簡便で安全性が高い等の利点がある。

そこで、本法を用いた食品衛生法の「食品、添加物等の規格基準 第3 器具及び容器包装」におけるポリ塩化ビニル材質試験のジブチルスズ化合物試験法の改正案を以下に示す。

ジブチルスズ化合物改正案

「B 器具又は容器包装一般の試験法」を以下のように改正する。

5 添加剤試験法

ジブチルスズ化合物

(1) 定性試験

試験溶液及びジブチルスズ標準溶液をそれぞれ2.0 mlを採り、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液5.0 ml及び2%テトラエチルホウ酸ナトリウム溶液1 mlを加えて直ちに密栓し、20分間激しく振り混ぜる。これを室温で約1時間静置した後、*n*-ヘキサン層を分取する。これらを1 µlずつ用いて、次の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行い、試験溶液のガスクロマトグラムと標準溶液のガスクロマトグラムのピークの検出時間

を比較する。

操作条件

カラム 内径0.25 mm、長さ30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフ用0~5%ジフェニルポリシロキサン含有ジメチルポリシロキサンを0.25 µmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 45 °Cで4分間保持した後、毎分15 °Cで昇温し、300 °Cに到達後10分間保持する。

試験溶液注入口温度 250 °C

検出器 ジブチルスズ誘導体は質量数263で検出する。

キャリアーガス ヘリウムを用い、ジブチルスズ誘導体が約13分で流出する流速に調節する。

(2) 定量試験

(1)定性試験において試験溶液のガスクロマトグラムのピークの検出時間とジブチルスズ標準溶液のガスクロマトグラムのピークの検出時間が一致するときは、次の試験を行う。

(1)定性試験の操作条件の下で得られた試験結果を基とし、試験溶液中のジブチルスズ誘導体についてピーク高さまたはピーク面積により定量を行い、ジブチルスズ化合物の含量を求める。

「C 試薬、試液等」の各項を以下のように追加もしくは改正する。

(追加)

1 試薬

テトラエチルホウ酸ナトリウム(C₂H₅)₄BNa 本品はテトラエチルホウ酸ナトリウム98%以上を含む

2 試液

2%テトラエチルホウ酸ナトリウム溶液：テトラエチルホウ酸ナトリウム0.4 gを水に溶かして20 mlとする。調製後

は直ちに使用する。

酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液 第1液：酢酸 11.4 ml を採り、水を加えて 100 ml とする。

第2液：酢酸ナトリウム 16.4 g を水に溶かして 100 ml とする。

第1液 3 容量と第2液 7 容量とを混和する。

(改正)

4 標準溶液、標準原液

ジブチルスズ標準溶液：二塩化ジブチルスズ 12.5 mg を採り、アセトンに溶かし塩酸を 2～3 滴加えて 100 ml とする。この液 1 ml を採り、*n*-ヘキサン及び塩酸 2～3 滴を加えて 100 ml とする。

「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」を以下のように改正する。

2 合成樹脂製の器具又は容器包装

(2) 個別規格

2. ポリ塩化ビニルを主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装

a. 材質試験

① ジブチルスズ化合物

試料を細切又は粉碎し、その 0.5 g を正確に量り、50 ml の共栓付フラスコに入れる。アセトン及び *n*-ヘキサンの混液 (3:7) 20 ml 及び塩酸 1 滴を加え、密栓をして約 40 °C に保ちながら時々振り混ぜて一晩放置する。冷後、この液をろ過し、ろ液及び洗液を合わせ、減圧濃縮器を用いて

40 °C 以下で約 1 ml まで濃縮する。次いで、*n*-ヘキサンを用いて 20 ml のメスフラスコに移し、*n*-ヘキサンを加えて 20.0 ml とする。毎分 2,500 回転で、約 10 分間遠心分離を行い、上澄液を試験溶液として添加剤試験法中のジブチルスズ化合物の試験を行うとき、その量は 50 ppm 以下でなければならない。

E. 文献

- 1) 河村葉子、前原玉枝、鈴木隆、山田隆：食品衛生学雑誌、41、246-253 (2000)
- 2) 大野浩之、鈴木昌子、岩間雅彦、中島重人、青山大器、山本勝彦：名古屋市衛生研究所報、42、17-20 (1996)
- 3) 大野浩之、鈴木昌子、中島重人、青山大器、三谷一憲：食品衛生学雑誌、43、208-214 (2002)
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000、587 (2000)
- 5) 塩ビ食品衛生協議会編：“塩化ビニル樹脂製品などの食品衛生に係る自主規格第 12 版” (1999)
- 6) 塩ビ食品衛生協議会 会報、112、1-11 (1995)
- 7) 馬場二夫、佐々木清司：食品衛生学雑誌、30、321-323 (1989)
- 8) Suzuki, T., Matsuda, R., Saito, Y., Yamada, H., J. Agric. Food Chem., 42, 216-220 (1994)

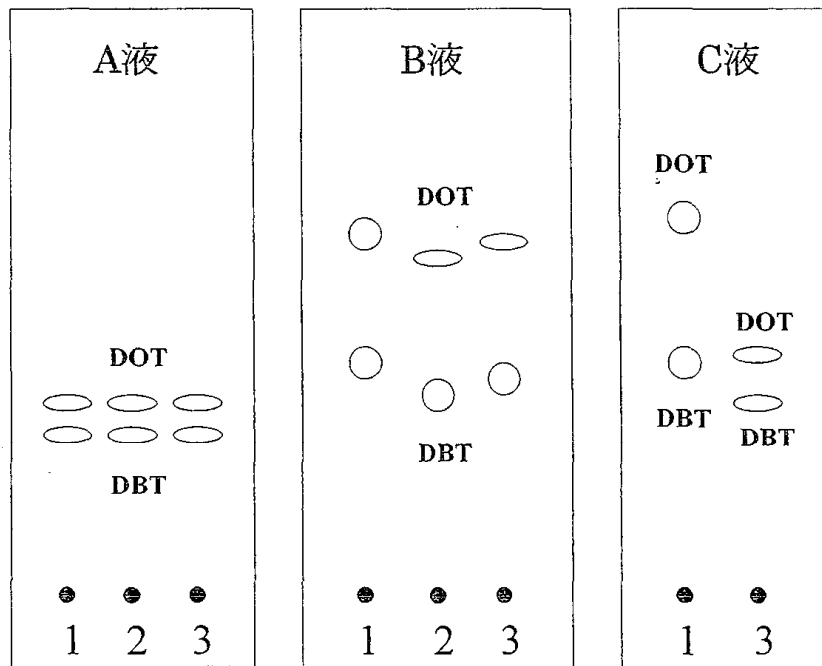


図1 各展開溶媒における添加回収試験 (50 $\mu\text{g/g}$) 溶液のTLC

展開溶媒; A液: *n*-ヘキサン-酢酸 (8 : 1)

B液: *n*-ヘキサン-2-プロパノール-酢酸 (7 : 3 : 0.1)

C液: アセトン-酢酸 (100 : 1)

試料; 1: 標準品 (絶対量 50 $\mu\text{g/g}$ 相当)、2: ラップフィルム, 3: 手袋

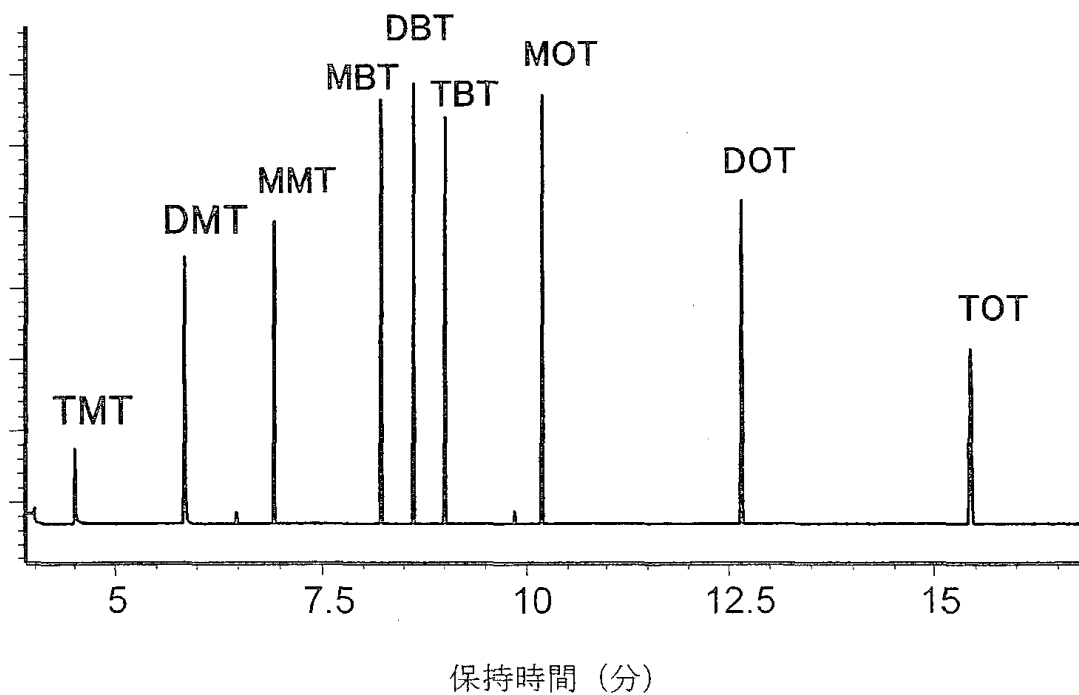


図2 GC/AEDによる有機スズ化合物標準溶液
(絶対量 50 $\mu\text{g/g}$ 相当) のクロマトグラム

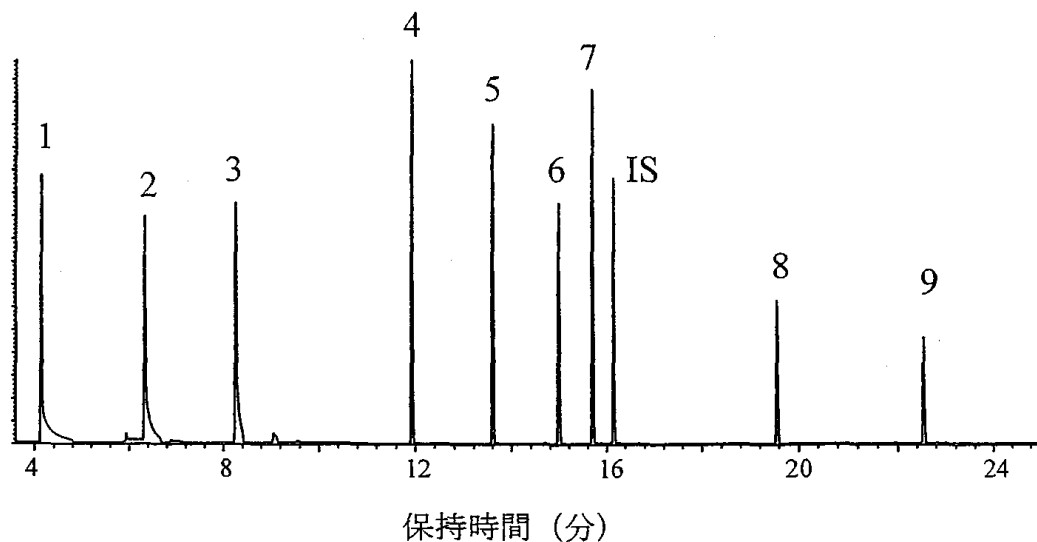


図3 GC/MSによる有機スズ化合物標準溶液

(絶対量 100 $\mu\text{g/g}$ 相当)のSIMクロマトグラム

1:TMT, 2:DMT, 3:MMT, 4:MBT, 5:DBT, 6:TBT, 7:MOT, 8:DOT, 9:TOT

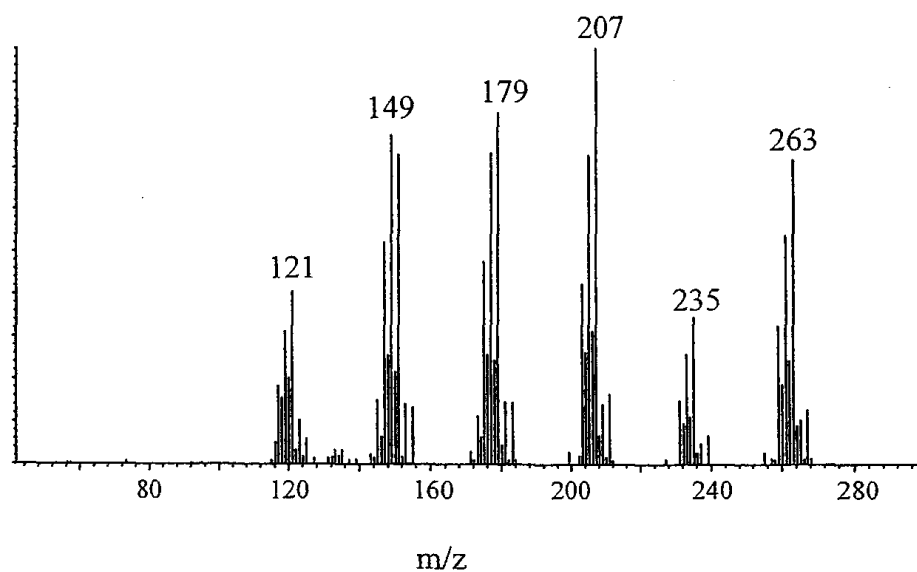


図4 ジブチルスズ化合物 (DBT) のエチル誘導体のマススペクトル

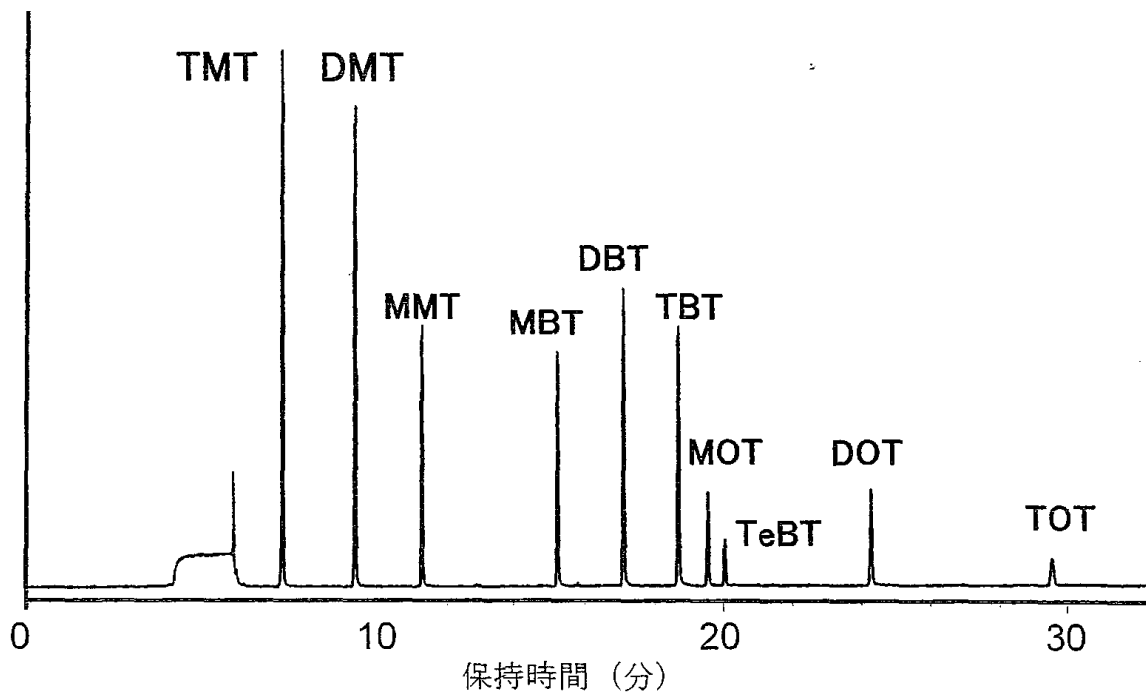


図5 GC-FPDによる有機スズ化合物標準溶液
(絶対量 50 $\mu\text{g/g}$ 相当) のクロマトグラム

表1 GC/MS測定における有機スズ化合物の定量イオン

化合物	定量イオン	確認イオン
Monomethyltin (MMT)	193	191, 189
Dimethyltin (DMT)	179	177, 175
Trimethyltin (TMT)	165	163, 161
Mono- <i>n</i> -butyltin (MBT)	235	233, 231
Di- <i>n</i> -butyltin (DBT)	263	261, 259
Tri- <i>n</i> -butyltin (TBT)	291	289, 263
Mono- <i>n</i> -octyltin (MOT)	291	289, 287
Di- <i>n</i> -octyltin (DOT)	375	373, 371
Tri- <i>n</i> -octyltin (TOT)	375	373, 459
Tetra- <i>n</i> -butyltin (TeBT)	291	289, 287

表2 ポリ塩化ビニル中の有機スズ化合物に対する抽出方法の比較

化合物	抽出量(μg/g)	
	溶解法	抽出法
MMT	81.4	85.0
DMT	305	280
DBT	18.6	20.5
MOT	162	182
DOT	6300	9750
TOT	67.0	91.2

溶解法:テトラヒドロフランによる溶解

n=2 or 3

抽出法:アセトン-*n*-ヘキサン (3:7) による抽出

表3 TLC法における展開溶媒とRf値の比較

展開溶媒	Rf値			
	標準溶液		添加試料(手袋)	
	DBT	DOT	DBT	DOT
<i>n</i> -ヘキサン-酢酸 (8:1)	0.29(○)	0.34(○)	0.29(○)	0.34(○)
<i>n</i> -ヘキサン-2-プロパノール-酢酸 (7:3:0.1)	0.44(○)	0.72(○)	0.41(○)	0.63(△)
アセトン-酢酸 (100:1)	0.42(○)	0.61(○)	0.33(△)	0.44(△)

DBT, DOT:25 μg/g相当, スポット量:5 μl, 展開距離:約10 cm

():検出感度の評価、○:はっきり確認可能、△:かろうじて確認可能

表4 検出器によるDBTの定量限界の比較

検出方法	注入量 (μl)	標準溶液 (ng/ml)	材質濃度 (μg/g)	アルキル化法
GC/AED	1	1	1.0	グリニャール試薬によるプロピル化
GC/MS	1	10	1.0	テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化
GC-FPD	5	100	10	テトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化
TLC法	5	5,000	25	アルキル化なし

表5 グリニャール試薬によるプロピル化とテトラエチルホウ酸ナトリウムによるエチル化の添加回収率の比較

試薬	誘導体	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)						
			DMT	TMT	MBT	DBT	TBT	DOT	TOT
グリニャール試薬	プロピル化	10	66.8 \pm 4.3	46.0 \pm 7.0	47.6 \pm 2.8	77.1 \pm 5.1	62.0 \pm 7.8	89.2 \pm 2.2	92.2 \pm 4.5
		100	46.5 \pm 5.8	58.0 \pm 8.8	50.7 \pm 4.3	90.3 \pm 10.3	92.3 \pm 8.8	85.8 \pm 13.2	87.5 \pm 15.7
テトラエチルホウ酸ナトリウム	エチル化	10	107.7 \pm 2.8	94.0 \pm 2.3	90.4 \pm 4.7	96.6 \pm 1.2	99.9 \pm 0.7	100.7 \pm 3.8	95.5 \pm 1.1
		100	102.2 \pm 2.2	105.0 \pm 3.7	85.1 \pm 2.7	99.4 \pm 0.9	101.2 \pm 1.1	97.6 \pm 1.8	95.9 \pm 3.4

回収率: アルキルスズは塩ビパウダーに添加し, 4~5試行の平均値 \pm S.D.で示した。

表6 テトラエチルホウ酸ナトリウムによりエチル化したアルキルスズの添加回収率

測定機関	試料	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)								
			MMT	DMT	TMT	MBT	DBT	TBT	MOT	DOT	TOT
機関A	ポリ塩化ビニルパウダー	10	90.4 \pm 8.6	107.7 \pm 2.8	94.0 \pm 2.3	90.4 \pm 4.7	96.6 \pm 1.2	99.9 \pm 0.7	95.4 \pm 5.0	100.7 \pm 3.8	95.5 \pm 1.1
		100	83.2 \pm 4.7	102.2 \pm 2.2	105.0 \pm 3.7	85.1 \pm 2.7	99.4 \pm 0.9	101.2 \pm 1.1	88.0 \pm 3.4	97.6 \pm 1.8	95.9 \pm 3.4
	ラップフィルム	10	49.1 \pm 5.2	99.8 \pm 2.3	95.9 \pm 4.3	75.8 \pm 4.7	97.3 \pm 0.9	98.4 \pm 1.2	118.1 \pm 5.2	102.0 \pm 1.5	108.3 \pm 4.0
		100	51.2 \pm 3.5	94.7 \pm 2.6	96.1 \pm 2.0	82.7 \pm 3.1	96.6 \pm 1.2	100.9 \pm 1.3	115.0 \pm 4.6	98.3 \pm 5.9	101.2 \pm 2.1
	手袋	10	61.7 \pm 5.7	91.1 \pm 2.8	92.3 \pm 2.8	76.6 \pm 3.8	99.0 \pm 2.9	98.3 \pm 1.9	96.7 \pm 4.3	105.5 \pm 5.2	116.3 \pm 4.2
		100	63.3 \pm 4.7	86.1 \pm 3.1	91.3 \pm 1.7	78.4 \pm 5.4	98.1 \pm 1.6	100.1 \pm 1.4	104.0 \pm 3.9	113.0 \pm 4.6	108.0 \pm 4.5
機関B	ポリ塩化ビニルパウダー	10		112.5 \pm 9.7	72.0 \pm 11.4		90.5 \pm 5.0	105.0 \pm 2.0		84.5 \pm 1.9	
		100		75.6 \pm 4.3	76.7 \pm 5.3		91.4 \pm 0.2	88.9 \pm 0.6		96.5 \pm 2.3	
	ラップフィルム	10		106.0 \pm 3.7	83.5 \pm 3.4		84.0 \pm 2.8	104.5 \pm 1.9		85.5 \pm 1.0	
		100		81.3 \pm 3.8	72.3 \pm 2.3		89.2 \pm 3.1	92.8 \pm 3.4		89.3 \pm 4.0	
	手袋	10		107.5 \pm 4.1	86.0 \pm 4.3		88.5 \pm 1.0	105.0 \pm 1.2		89.0 \pm 2.6	
		100		83.5 \pm 4.0	72.7 \pm 1.8		86.7 \pm 1.8	89.7 \pm 0.9		97.9 \pm 3.0	

回収率: アルキルスズは塩ビパウダーに添加し, 3~4試行の平均値 \pm S.D.で示した。