

- 14) Pool, B.L., et al, Detection of mutations in bacteria and of DNA damage and amplified DNasequences in mammalian cells as a systematic test strategy for elucidating biological activities of chemical carcinogens, *Fd Chem. Toxic.*, **24**, 685-691 (1986)
- 15) Boyes, B.G., et al, Evaluation of genotoxicity of *N*-nitrosodibenzylamine in Chinese hamster V79 cells and Salmonella, *Mutation Research*, **241**, 379-385 (1990)
- 16) Jiao, J., et al, Analysis of tissue-specific *lacZ* mutations induced by *N*-nitrosodibenzylamine in transgenic mice, *Carcinogenesis*, **18**, 2239-2245 (1997)
- 17) ラテックスアレルギー研究会ホームページ、<http://www.latex.jp/>
- 18) Nutter A.F., Contact urticaria to rubber, *Br J. Dermatol.*, **101**, 597 (1979)
- 19) 松永佳世子編、ラテックスアレルギーのすべて—安全対策ガイドライン準拠、(ISBN 978-4-87962-349-2) (2007)
- 20) Yassin M.S., et al, Latex allergy in hospital employees, *Ann Allergy*, **72**, 245-249 (1994)
- 21) Kelly, K.J., Contact dermatitis due to chemical hypersensitivity, *Surgery, AnsellCares Newsletter*, **4**, 1-2 (1996)
- 22) 加納尚生ら：アレルギー、**53**、659-668 (2004)
- 23) 中出伸一：ラテックスアレルギーフォーラム活動の総括、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**7**、24-29 (2003)
- 24) 早川律子：ラテックスアレルギー27症例のまとめ、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**2**、24-29 (1998)
- 25) 原田 晋：1999年度にLAFに報告されたラテックスアレルギー疑い患者の集計結果及び考察、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**4**、18-22 (2000)
- 26) 西岡和恵：2000年度に報告されたラテックスアレルギー患者の集計結果及び過去3年間の集計と比較検討、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**5**、41-45 (2001)
- 27) 大砂博之：2001年度に報告されたラテックスアレルギー患者の集計結果、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**6**、61-66 (2002)
- 28) 杉浦真理子：ラテックスアレルギー調査結果—2002年—、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**7**、63-69 (2003)
- 29) ゴムのアレルギーと手荒れのホームページ、ゴムアレルギー相談室—過去の相談例、<http://www14.ocn.ne.jp/~ganda/cons-aldb.html>
- 30) 中出伸一ら：ラテックスアレルギー対策NRL 製品設計の仮指針、日本ゴム協会誌、**71**、168-172 (1998)
- 31) US Food and Drug Administration, Allergic Reactions to Latex-Containing Medical Devices, *FDA Medical Bulletin*, **2**, 2 (1991)
- 32) 厚生省薬務局：医薬品副作用情報、No. 113 (1992年3月)
- 33) 平成11年3月25日 厚生省医薬安全局安全対策課長通知 医薬安第34号 (1999)
- 34) Code of Federal Regulation, Title 21, § 801.437, User labeling for devices that contain natural rubber (1997)
- 35) ASTM Internastional, ASTM D-3577-09 Standard specification for rubber surgical gloves (2009)
- 36) ASTM International, ASTM D-3578-05 Standard specification for rubber examination gloves (2005)
- 37) 中出伸一：グローブの対アレルギー安全性に関する最近の状況、日本ラテックスアレルギー研究会誌、**12**、71-80 (2008)
- F. 健康危害情報
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

器具・容器包装に残存する化学物質に関する研究

研究代表者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者 中里 光男 東京都健康安全研究センター

研究要旨

食品と接触して使用される器具・容器包装には合成樹脂製品、ゴム製品、ガラス製品等様々なものがあり、これらには強度、性能、機能等を向上させるための各種添加剤や製造工程中に生ずる副反応物等、多くの化学物質が含まれている。これらの化学物質は使用条件によっては食品中に溶出することがある。そこで、器具・容器包装の安全性を確保するために、食品衛生法により材質別に各種の規格が定められているが、それを保障するためには規格試験に基づき常に市販品の調査を行う必要がある。また、規格未整備のものについて、規格基準を設定する場合には分析法の検討や実態調査を含む基礎的資料の収集が不可欠である。今回はこのようなものの中からポリ乳酸製品、ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶりの *N*-ニトロソアミン類について検討を行った。

代表的なバイオマスプラスチックであるポリ乳酸製品 7 試料について、食品衛生法における規格試験を実施するとともに、その他の含有化学物質等の調査を行い安全性を評価した。その結果、全ての試料が食品衛生法における規格基準を満たしており、金属の溶出もほとんど見られなかった。また、溶出液について GC/MS によるピーク検索及び 2 種類の変異原性試験を実施したところ、GC/MS において大きなピークは見られず、2 種類の変異原性試験においても全ての試料が陰性を示した。しかしながら、充填剤を多く配合し、さらにポリウレタン塗装を施すことによって耐熱性を改善した製品については、塗装が剥げたりひびが入った場合に金属等の溶出量が急増したり、内部のポリ乳酸の分解が急速に進む恐れが認められた。

ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶりの *N*-ニトロソアミン類及び *N*-ニトロソ化可能物質類の試験法を検討した。*N*-ニトロソアミン類の測定には化学発光窒素検出器または熱エネルギー分析計が用いられているが、これらを所有する試験機関は少なく、国内で試験を行うことが難しいため、汎用性が高い GC/MS による方法を検討した。試験溶液の調製法としては世界的に汎用されている欧州規格 EN 12868 に準拠することにより、10 種類の *N*-ニトロソアミン類を対象とした分析法を作成した。本法の定量限界は *N*-ニトロソアミン類で 1.0 ~ 1.5 µg/kg、*N*-ニトロソ化可能物質類で 4~6 µg/kg であり、欧州指令 93/11/EEC の規制値の 1/5 及び 1/15 以下まで定量可能であった。また、検出器の選択性も実用上問題は

なかった。添加回収率は *N*-ニトロソアミン類で 58~109%、*N*-ニトロソ化可能物質類で 59~102%とほぼ良好であった。さらに煮沸液または溶出液中の第二級アミン類を LC/MS で測定することによりスクリーニングや確認を行うことができた。

研究協力者

六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所	大森 清美	神奈川県衛生研究所
阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所	藤巻 照久	神奈川県衛生研究所
尾崎 麻子	大阪市環境科学研究所	石井 里枝	埼玉県衛生研究所
金子 令子	東京都健康安全研究センター	岩松 巳佳子	長野県環境保全研究所
羽石 奈穂子	東京都健康安全研究センター	景山 知子	静岡県環境衛生科学研究所
小林 真理	東京都健康安全研究センター	中野 昌枝	静岡市環境保健研究所
大野 浩之	名古屋市衛生研究所	井之上 浩一	金城学院大学

＜その1＞ポリ乳酸製器具・容器包装の安全性に関する研究

研究協力者 尾崎麻子、大嶋智子、大垣寿美子 大阪市立環境科学研究所

A. 研究目的

食品用器具・容器包装には、ポリエチレンやポリプロピレンをはじめとする石油由来のプラスチックが広く使用されているが、廃棄後に焼却処分され、大気中の二酸化炭素濃度を上昇させる一因となっている。そこで、環境負荷の低減、すなわち二酸化炭素の発生を抑制するために植物由来樹脂（バイオマスプラスチック）の開発がすすめられてきた。原料である植物は、成長過程で光合成することによって大気中の二酸化炭素を吸収するため、廃棄後の焼却処分でも二酸化炭素を発生しても、トータルでは大気中の二酸化炭素を増加させないことになる。このようにトータルで二酸化炭素の増減に影響を与えないということからカーボンニュートラルと呼んでいる。

ポリ乳酸は最も研究及び実用化が進んだバイオマスプラスチックであり、主にトウモロコシから得られるデンプンを発酵して得た乳酸またはその環状2量体のラクチドを重合してつくられる（図1）。我が国では平成17年に食器への実用化が開始され、平成19年10月には食品衛生法においてポリ乳酸を用いた器具・容器包装に対して新たに個別規格が設けられた。

そこで、現在流通しているポリ乳酸製器具・容器包装を収集して食品衛生法における規格試験を実施するとともに、その他の含有化学物質等の調査を行い、安全性を評価した。

B. 研究方法

1. 試料

表1に示す7試料について試験を行った。

2. 試薬及び標準溶液

L-乳酸リチウム、D-乳酸リチウム：純度97%、シグマアルドリッチ社製

35元素混合標準溶液：XSTC-622、10 μg/mL、SPEX製

過マンガン酸カリウム溶液：0.002 mol/L、容量分析用、シュウ酸ナトリウム：0.005 mol/L、容量分析用 以上和光純薬工業㈱製
有機溶媒類：高速液体クロマトグラフ用または残留農薬試験用、和光純薬工業㈱製または関東化学㈱製

硝酸、塩酸、硫酸：有害金属測定用、関東化学㈱製

L-乳酸標準溶液：L-乳酸リチウム107 mgを採り、水を加えて100 mLとし1000 μg/mLの標準溶液を作成した。適宜水で希釈して1~100 μg/mLとなるように調製した。D-乳酸標準溶液もD-乳酸リチウムを用いて上記と同様に調製した。

3. 装置

液体クロマトグラフ（HPLC）：HP 1100、Agilent Technologies社製

熱分解ガスクロマトグラフ：熱分解装置JCI-22、日本分析工業㈱製、ガスクロマトグラフ14AH、㈱島津製作所製

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 Agilent Technologies社製

ICP 発光分光分析計（ICP-AES）：IRIS 1000、サーモジャーレルアッシュ社製

マイクロウエーブ分解装置：Anton Paar マルチウエーブ、パーキンエルマー社製

超遠心粉碎機：Retsch、日本精機㈱製

4. 測定条件

(1) HPLC (総乳酸)

カラム: ODS-80T s (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μ m)、東ソー製

カラム温度: 40°C

移動相: リン酸-アセトニトリル-水 (0.1:1:99)

流速: 1 mL/min

注入量: 100 μ L

測定波長: UV (210 nm)

(2) HPLC (L 及び D-乳酸)

カラム: SUMICHIRAL OA-6100 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μ m)、住化分析センター製

カラム温度: 40°C

移動相: 1 mmol/L 硫酸銅-アセトニトリル (99:1)

流速: 1 mL/min

注入量: 20 μ L

測定波長: UV (254 nm)

(3) GC/MS

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

カラム温度: 50°C (2 min) - 15°C/min - 300°C (10 min)

注入口温度: 250°C

キャリアーガス: He, 1 mL/min

注入量: 1 μ L

測定モード: SCAN (m/z : 50-800)

(4) ICP-AES

高周波出力: 1150 W

プラズマガス (Ar): 14 L/min

補助ガス (Ar): 0.5 L/min

ネブライザ圧力: 26 psi

測定波長 (nm): Ag (338.289),

Al (396.152), As (189.042), Ba (233.527),

Ca (393.366), Cd (228.802), Co (238.892),

Cr (267.716), Cu (224.700), Fe (259.940),

Mg (279.553), Mn (260.569), Ni (232.003),

Pb (220.353), Si (251.612), Sn (189.989),
Ti (323.452), Zn (213.856)

5. 材質判別

熱分解クロマトグラフを用いて測定を行った。得られたクロマトグラムパターンを材質が明らかなプラスチックのクロマトグラムパターンと比較することにより材質の判別を行った。表面に塗装が施されているものについては、素地と塗装のそれぞれについて測定した。

6. 材質構成成分における D-乳酸含有率

六鹿ら¹⁾の方法に従い、細切した試料 1 g に 1 mol/L 水酸化ナトリウム/メタノール-水 (3:1) 溶液 20 mL を加え、振とうしながら 65°C で 1 時間加熱し、ポリマーをアルカリ分解して乳酸とした。この溶液 1 mL に 2 mol/L 塩酸を 0.5 mL 加えて中和した後、水を加えて 50 mL とした。HPLC により L-乳酸量及び D-乳酸量を測定し、総乳酸量に対する D-乳酸量の比率を求めた。

7. 食品衛生法による規格試験

(1) 溶出液の調製

試料を水でよく洗い、表面積 1 cm² につき 2 mL の割合の水、4% 酢酸、20% エタノール及びヘプタンを浸出用液として用いた。水及び 4% 酢酸では 60°C 及び 95°C、20% エタノールでは 60°C に保ちながら 30 分間、ヘプタンでは 25°C に保ちながら 1 時間放置し溶出液とした。

(2) 総乳酸

水を浸出用液として得た溶出液及び乳酸標準溶液をそれぞれ 1 mL 採り、各々に 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム試液を 100 μ L 加えて密栓し、60°C に保ちながら時々振り混ぜて 15 分間放置した。冷後、0.2 mol/L リン酸を 100 μ L 加え、HPLC 用の試験溶液と

した。

(3) 蒸発残留物試験

水、4%酢酸、20%エタノール及びヘプタンを浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、食品、添加物等の規格基準第三器具及び容器包装の蒸発残留物試験法に従って測定した。

(4) 過マンガン酸カリウム消費量試験

水を浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、食品、添加物等の規格基準第三器具及び容器包装の過マンガン酸カリウム消費量試験法に従って測定した。

(5) 重金属試験

4%酢酸を浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、食品、添加物等の規格基準第三器具及び容器包装の重金属試験法に従って測定した。

8. 含有及び溶出金属の測定

(1) 材質試験

液体窒素で凍結させた試料を超遠心粉碎機を用いて粉碎し、マイクロウェーブ分解法により試験溶液を調製した後、ICP-AESを用いて鉛及びカドミウムを含む18元素の測定を行った。

ただし、給食用食器及び汁椀をマイクロウェーブ分解した際に白色沈殿が観察され完全に分解することができなかった。そこで、乾式灰化法による分解を行ったところ、白色沈殿は見られたもののチタンの測定値がマイクロウェーブによる分解に比べて給食用食器及び汁椀のそれぞれで16及び4倍となった。よって、チタンについてのみ乾式灰化法による測定を行った。表面に塗装が施されているものについては素地と塗装に分けずに粉碎し、全体について試験を行った。

1) マイクロウェーブ分解法

試料 200 mg を石英製分解容器に採り、硝

酸 4 mL と塩酸 1 mL を加え、マイクロウェーブ分解装置により分解を行った。分解装置の加熱プログラムは 300W (2 min) - 400W (6 min) - 800W (15 min) とした。室温まで冷却後、水を加えて 20 mL とし、ろ過後、適宜希釈して試験溶液とした。

2) 乾式灰化法

試料 100 mg を耐熱ガラス製ビーカーに採り、硫酸 1 mL を加えて除々に加熱し、大部分が炭化するまで加熱した。これを 450°C の電気炉で灰化した。この残留物に塩酸 (1 → 2) 5 mL を加えてかき混ぜ、ホットプレート上で蒸発乾固した。冷後 0.1 mol/L 硝酸 30 mL を加えて溶解し、ろ過後、適宜希釈して試験溶液とした。

(2) 溶出試験

4%酢酸を浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、ICP-AES を用いて測定を行った。

9. GC/MS による溶出物の探索

ヘプタンを浸出用液として得た溶出液を試験溶液とし、GC/MS の SCAN モードで測定を行い、溶出化合物の探索を行った。

10. 変異原性試験

(1) 試験溶液の調製

水、20%エタノール及びヘプタンを浸出用液として得た溶出液を試験溶液とした。水溶出液はそのまま試験に供した。20%エタノール及びヘプタン溶出液はそれぞれ 1 mL を採り、窒素を吹き付けて乾固した。ただし、20%エタノール溶出液は 50°C のヒートブロックで加熱した。ジメチルスルホキシド 100 μ L を加えて溶解し試験溶液とした。

(2) レックアッセイ

1) 使用培地及び菌株

培地：B-2 寒天培地 (肉エキス 1 g、ポリ

ペプトン 1 g、塩化ナトリウム 0.5 g、寒天 0.8 g、蒸留水 100 mL)

菌株: *Bacillus subtilis* の野生株 H17 *Rec⁺* 及び DNA 組み換え修復欠損株 M45 *Rec⁻* の孢子懸濁液を用いた。

2) 試験方法

H17 株及び M45 株それぞれについて孢子一定量 (2×10^5) を混和した寒天培地 10 mL をシャーレ (直径 90 mm) に採り、培地が固まったのち直径 8 mm のペーパーディスクを培地上にのせ、試験溶液 40 μ L をディスクに染み込ませた。37°C で 24 時間培養したのち、生育阻止円の大きさを測定した。H17 株及び M45 株いずれかに生育阻止円がみられた試料を、細胞毒性があると判定した。さらに、M45 株の生育阻止円が H17 株のものよりも大きい場合は、DNA 損傷性があると判定した。

(3) *umu*-テスト

umu-テストに基づく試験用キット (ウムラック AT、(株) 蛋白質精製工業) を用いた。

菌株は NM2009 株を用い、代謝活性化系 (S9+) 及び非代謝活性化系 (S9-) の両方について試験を行った。*umu* 遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性を指標として比色測定 (620 nm) を行い、各試料が溶媒対照の 2 倍以上の吸光度を呈した場合に陽性とした。

C. 研究結果及び考察

1. 試料の材質判別

サラダ容器、青果用袋、卵パック、スプーン及びコップの材質はポリ乳酸のみから構成されていた。ポリ乳酸製品の多くは熱に弱い。サラダ容器、青果用袋及び卵パックは低温での利用を想定された製品であり、スプーン及びコップについても耐熱性が 50°C と明記されていた。

一方、耐熱性が 120°C と高く、より高温

で利用を想定された給食用食器及び汁椀はいずれもポリ乳酸を素地としてポリウレタン塗装されたものであった (表 1)。食品に接触する面がポリウレタンであることからポリ乳酸の個別規格は適用されないが、以下、他の試料とともにポリ乳酸の個別規格を含めて試験を行った。

2. 材質構成成分の D-乳酸含有率

食品衛生法において、使用温度が 40°C を超える器具・容器包装を製造する場合は、D-乳酸含有率が 6% を超えるポリ乳酸を使用してはならない (ただし、100°C 以下で 30 分以内または 66°C 以下で 2 時間以内で使用するものはこの限りでない) と規定されている。表 1 に示したように D-乳酸含有率は全ての試料において 1.3~4.4% と 6% を下回っており、基準を満たしていた。

3. 食品衛生法による溶出試験

溶出試験結果を表 2 に示した。給食用食器及び汁椀の使用温度は 100°C を超えないが、他の試料に比べて高温で使用されることから、水及び 4% 酢酸を浸出用液にした際に参考として 95°C における溶出試験も併せて行った。

総乳酸、過マンガン酸カリウム消費量及び重金属試験では全ての試料及び条件において検出限界以下であった。汁椀を 4% 酢酸を用いて 95°C で 30 分間溶出させた際の蒸発残留物は 7.4 μ g/mL であったが、ポリ乳酸や他の材質の蒸発残留物の規格値である 30 μ g/mL を下回っており、問題となるものではなかった。

4. 含有及び溶出金属

材質に含有される金属の測定結果を表 3 に示した。食品衛生法で規格が設けられている鉛及びカドミウムは全ての試料で検出

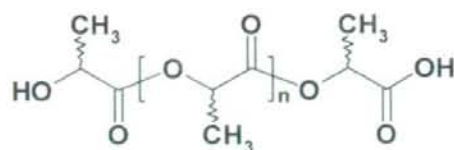


図1 ポリ乳酸

表1 検討に用いたポリ乳酸製器具・容器包装試料

試料	耐熱温度	材質 ¹⁾	D-乳酸含有率 ²⁾ (%)
サラダ容器	40℃	ポリ乳酸	4.4
青果用袋	-	ポリ乳酸	1.4
卵パック	-	ポリ乳酸	4.0
スプーン	50℃	ポリ乳酸	1.3
コップ	50℃	ポリ乳酸	1.3
給食用食器	120℃	素地:ポリ乳酸 塗装:ポリウレタン	1.3
汁椀	120℃	素地:ポリ乳酸 塗装:ポリウレタン	1.4

1) 熱分解ガスクロマトグラフにより材質判別を行った

2) 材質構成成分としてのD-乳酸含有率

表2 ポリ乳酸製器具・容器包装の規格試験における溶出試験結果

試料	溶出条件	総乳酸 ($\mu\text{g/mL}$)	蒸発残留物 ($\mu\text{g/mL}$)				過マンガン酸 カリウム消費量 ($\mu\text{g/mL}$)	重金属 ($\mu\text{g/mL}$)
			水	4%酢酸	20% エタノール	ヘプタン ²⁾		
サラダ容器	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
青果用袋	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵パック	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
スプーン	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
コップ	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
給食用食器 ¹⁾	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	95℃・30分	ND	ND	ND	-	-	ND	ND
汁椀 ¹⁾	60℃・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	95℃・30分	ND	ND	7.4	-	-	ND	ND
検出限界値		1 $\mu\text{g/mL}$		5 $\mu\text{g/mL}$			1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ (Pbとして)
規格基準値		30 $\mu\text{g/mL}$		30 $\mu\text{g/mL}$			10 $\mu\text{g/mL}$ 以下	1 $\mu\text{g/mL}$ 以下 (Pbとして)

ND<検出限界値

1) ポリ乳酸の素地にウレタン塗装が施してあるため、食品衛生法上は蒸発残留物及び総乳酸試験は実施されない

2) ヘプタンは25℃・1時間で得た溶出試験溶液について試験した

表3 ポリ乳酸製器具・容器包装の金属材料含有量(μg/g)

	Cd	Pb	As	Sn	Mg	Al	Si	Ca	Ti	Cr	Fe	Zn	Ba	Mn	Co	Cu	Ag	Ni
サラダ容器	ND	ND	ND	16	30	ND	150	4.4	ND	ND	6.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
青果用袋	ND	ND	ND	24	12	69	190	55	ND	ND	6.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵パック	ND	ND	ND	26	10	ND	180	1.8	ND	ND	3.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
スプーン	ND	ND	ND	15	17	43	160	2.8	120	5.4	52	130	130	ND	ND	ND	ND	2.5
コップ	ND	ND	ND	23	12	32	85	31	98	1.3	15	130	40	ND	ND	ND	ND	ND
給食用食器	ND	ND	ND	26	4800	65	1700	320	3100	8.8	53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
汁椀	ND	ND	ND	17	7400	74	2000	1400	420	ND	560	5.8	300	ND	ND	ND	ND	ND

サラダ容器、青果用袋、卵パック、スプーン、コップ: Cd, Pb, Sn, Mg, Ca, Cr, Fe, Zn, Ba, Mn, Co, Cu, Ni: ND<1μg/g, As, Al, Si, Ti, Ag: ND<3μg/g
給食用食器、汁椀: Cd, Pb, Sn, Mg, Ca, Cr, Fe, Zn, Ba, Mn, Co, Cu, Ni: ND<3μg/g, As, Al, Si, Ti, Ag: ND<15μg/g

表4 ポリ乳酸製器具・容器包装からの金属溶出量(μg/mL)

	溶出条件	Pb	As	Sn	Mg	Al	Si	Ca	Ti	Cr	Fe	Zn	Ba	Mn	Co	Cu	Ag	Ni
サラダ容器	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
青果用袋	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵パック	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
スプーン	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
コップ	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
給食用食器	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	95°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
汁椀	60°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	95°C・30分	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	0.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND<0.2μg/mL

されず、また、同じく有害金属であるヒ素も全ての試料で検出されなかった。一方、ズズは全ての試料から 15~26 $\mu\text{g/g}$ 検出され、製品に成型される前のポリ乳酸シートから検出されたズズの含有量 (3~32 $\mu\text{g/g}$)¹⁾ とよく一致しており、ポリ乳酸重合時の触媒として一般的な 2-エチルヘキサン酸ズズが使用されたと推測される。

また、全ての試料からマグネシウム、カルシウム、鉄、ケイ素が検出され、一部の試料からアルミニウム、チタン、クロム、亜鉛、バリウム及びニッケルが検出された。これらは製品に成型される前のポリ乳酸シートからは検出されていないことから¹⁾、充填剤や顔料等として添加された可能性が高い。

耐熱性が 120°C と高く設定されている給食用食器及び汁椀では耐熱性の低いサラダ容器等の試料に比べてマグネシウム、ケイ素、カルシウム、チタン等の含有量が著しく高かった。これらを含む化合物は充填剤として使用されることから、本来耐熱性の低いポリ乳酸の耐熱性を上げるために充填剤が大量に配合されたものと推測された。

それぞれの金属の 4% 酢酸への溶出量を表 4 に示した。給食用食器及び汁椀を 95°C で 30 分間溶出させた際にケイ素がそれぞれ 0.4 及び 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 溶出した。また、汁椀を 60 及び 95°C で 30 分間溶出させた際にカルシウムが 0.4 及び 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 溶出した。しかし、いずれも溶出量は低く、問題となるものではなかった。

5. GC/MS による溶出物の探索

ヘプタン溶出液について GC/MS により溶出物の探索を行ったが、全ての試料において大きなピークは検出されなかった。

6. 変異原性試験

レックアッセイの結果を表 5 に示した。すべての試料及び溶出条件において H17 及び M45 株に生育阻止円は見られず、遺伝毒性は示されなかった。

umu-テストの結果を表 6 に示した。*umu*-テストはエイムステストに比べ短い時間で結果が得られ、かつ、*umu*-テスト及びエイムステストの結果には約 90% という非常に高い相関性が認められている²⁾。そのため、上水・下水試験法の公定法としても採用されている。表 6 に示したように、溶媒対照の 2 倍以上の吸光度を呈して陽性と判定された試料はなかったが、汁椀のヘプタン溶出液では代謝活性化法において約 1.5 倍の発光強度の増加がみられた。本試験で用いた NM2009 株は、TA1535/pSK1002 株に *o*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を導入したもので、特に芳香族アミン類及びニトロ化合物に高い感受性を示す。

本汁椀はポリ乳酸にポリウレタン塗装されたものであり、ポリウレタン塗装合成樹脂製品の材質中には原料のイソシアネート類やそれらが分解したアミン類が存在することが報告されている^{3),4)}。イソシアネート化合物はイソシアネート基が水と反応して容易にアミン基へと変化することが知られており、2,6-トルエンジイソシアネート及び 2,4-トルエンジイソシアネートのイソシアネート基がアミン基になった 2,6-トルエンジアミン及び 2,4-トルエンジアミンは *umu*-テストの代謝活性化法において陽性を示す⁵⁾。イソシアネート類やアミン類は極性が比較的高いことからヘプタンよりも 20% エタノールに多く溶出するが⁴⁾、汁椀の 20% エタノール溶出液では発光強度の増加が全く見られなかった。これは、試験溶液を調製する際に 20% エタノール溶出液を加熱下で窒素を吹き付けて乾固したことか

表5 ポリ乳酸製器具・容器包装溶出液のレックアッセイ

試料	溶出条件	生育阻止円の直径 (mm)			
		M45	H17	M45-H17	
サラダ容器	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
青果用袋	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
卵パック	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
スプーン	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
コップ	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
給食用食器	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
		95℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
汁椀	水	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
		95℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	20%エタノール	60℃・30分	— ¹⁾	— ¹⁾	—
	ヘプタン	25℃・1時間	— ¹⁾	— ¹⁾	—
AF-2 ²⁾		0.04 μg/disc	27	22	5
		0.02 μg/disc	23	18	5

水溶出液はそのまま試験に供し、20%エタノール及びヘプタン溶出液は10倍濃縮後に試験に供した

1) 生育阻止円を認めなかった

2) 陽性対照物質: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

表6 ポリ乳酸製器具・容器包装溶出液のumu-テスト

試料	溶出条件	検体濃度/アッセイ		β -ガラクトシダーゼ (吸光度)	
		(μ L)	(μ g)	S9(-)	S9(+)
溶媒対照(DMSO)		4		0.43 \pm 0.01	0.45 \pm 0.03
サラダ容器	20%エタノール	4		0.40 \pm 0.01	0.43 \pm 0.02
	ヘプタン	4		0.46 \pm 0.03	0.43 \pm 0.02
青果用袋	20%エタノール	4		0.40 \pm 0.02	0.41 \pm 0.00
	ヘプタン	4		0.44 \pm 0.01	0.44 \pm 0.00
卵パック	20%エタノール	4		0.42 \pm 0.01	0.45 \pm 0.05
	ヘプタン	4		0.49 \pm 0.01	0.53 \pm 0.10
スプーン	20%エタノール	4		0.43 \pm 0.03	0.43 \pm 0.00
	ヘプタン	4		0.47 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02
コップ	20%エタノール	4		0.43 \pm 0.02	0.46 \pm 0.01
	ヘプタン	4		0.46 \pm 0.01	0.52 \pm 0.00
給食用食器	20%エタノール	4		0.44 \pm 0.02	0.49 \pm 0.00
	ヘプタン	4		0.46 \pm 0.02	0.40 \pm 0.07
汁椀	20%エタノール	4		0.51 \pm 0.00	0.49 \pm 0.00
	ヘプタン	4		0.49 \pm 0.01	0.75 \pm 0.04
AF-2 ¹⁾			0	0.49 \pm 0.05	—
			0.003	1.89 \pm 0.30*	—
2AA ²⁾			0	—	0.64 \pm 0.06
			0.003	—	1.78 \pm 0.05*

それぞれの溶出液は10倍濃縮後に試験に供した

*溶媒対照の2倍以上の吸光度を呈した場合を陽性とした

1) 陽性対照物質: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2) 陽性対照物質: 2-aminoanthracene

ら、イソシアネート類やアミン類が揮散してしまったものと考えられる。

以上より、汁椀で見られた発光強度の増加は素地であるポリ乳酸から溶出した化合物によるものではなく塗装面のポリウレタン由来である可能性が高い。

D. 結論

ポリ乳酸はポリエチレンやポリプロピレンなどの汎用プラスチックに比べて耐熱性、耐加水分解性などの特性は劣っているが、原料が植物由来であるためカーボンニュートラルであるとして注目され、市場においてポリ乳酸製の器具・容器包装が流通するようになってきた。また、ポリ乳酸の欠点である耐熱性を向上させた製品も開発されてきており、エコの観点から今後使用が拡大するものと考えられる。

今回の試験では、ポリ乳酸製の器具・容器包装 7 試料について食品衛生法における規格試験を含め、種々の試験を行い安全性を評価した。その結果、全ての試料が食品衛生法における規格基準を満たしており、金属の溶出もほとんど見られなかった。

しかしながら、充填剤を多く配合し、さらに塗装を施すことによって本来熱に弱いポリ乳酸の耐熱性を上げている製品については、塗装が剥げたりひびが入った場合に金属等の溶出量が急増したり、内部のポリ乳酸の分解が急速に進む恐れがある。

未知化合物が溶出して健康を害する可能性を加味し、GC/MS によるピーク検索及び 2 種類の変異原性試験を実施した。その結果、GC/MS において大きなピークは見られなかった。また、変異原性試験では、レックアッセイ及び *umu*-テストの両方において全ての試料が陰性を示した。汁椀のヘプタン溶出液が発光強度を若干増加させたが、これは素地であるポリ乳酸からの溶出物による

ものではなく、塗装面のポリウレタンによるものと推測された。

E. 参考文献

- 1) 六鹿元雄、河村葉子、棚元憲一：日本食品化学学会誌、14(2)、87-92 (2007)
- 2) Reifferscheid, G., Validation of the SOS/*umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data, Mutation Research, 369, 129-145 (1996).
- 3) 河村葉子、六鹿元雄：平成19年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品用器具・容器包装、乳幼児用玩具及び洗浄剤の安全性確保に関する研究 総括・分担研究報告書、ポリウレタン製品中のイソシアネートの分析、71-86 (2008)
- 4) 井上たき子、石綿肇、谷村顕雄：食品衛生学雑誌、26(4)、326-330 (1985)
- 5) Oda, Y., et al, Development of high sensitive *umu* test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity, Mutation Research, 334, 145-156 (1995).

＜その2＞ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶり中の *N*-ニトロソアミン類分析法

研究代表者 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

A. 研究目的

N-ニトロソアミン類は *N*-ニトロソ基 (>*N*-*N*=O) を有する化合物の総称で、それらの中には発がん性を有するものがあることから問題とされる。国際がん研究機関 (IARC) では *N*-ニトロソジメチルアミン (NDMA) 及び *N*-ニトロソジエチルアミン (NDEA) をグループ 2A (ヒトに対しておそらく発がん性がある)、*N*-ニトロソジブチルアミン (NDPA)、*N*-ニトロソジブチルアミン (NDBA)、*N*-ニトロソピペリジン (NPIP)、*N*-ニトロソピロリジン (NPYR) 及び *N*-ニトロソモルホリン (NMOR) をグループ 2B (ヒトに対して発がん性があるかもしれない) に分類している¹⁾。また、*N*-ニトロソジベンジルアミン (NDBzA)、*N*-ニトロソメチルフェニルアミン (NMPHA)、*N*-ニトロソエチルフェニルアミン (NEPHA) は変異原性を有するとの報告がある²⁻⁵⁾。

ゴム製品では、製造時に添加される加硫促進剤のジチオカルバミン酸塩類やチウラム類が分解して第二級アミン類を生成する。また、老化防止剤としてジフェニルアミン系の第二級アミンが添加されることがある。その一部が環境中に存在するあるいは製造時に使用される亜硝酸などの窒素酸化物と反応すること

により *N*-ニトロソアミン類が生成する (図1)。また、ゴム製品から溶出した第二級アミン類が胃内で亜硝酸と反応して *N*-ニトロソアミン類を生成する可能性もある。

ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶりについては、欧州連合では欧州指令 93/11/EEC により総 *N*-ニトロソアミン類溶出量を 10 µg/kg、総 *N*-ニトロソ化可能物質類溶出量を 100 µg/kg 以下と規制している⁶⁾。また、米国では推奨基準である米国材料試験協会 (ASTM) F1313-90 により *N*-ニトロソアミン含有量を化合物ごとに 10 µg/kg 以下、合計量を 20 µg/kg 以下としている⁷⁾。一方、わが国の食品衛生法では、*N*-ニトロソアミン類及び *N*-ニトロソ化可能物質類の規格は定められていない。

ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶりの *N*-ニトロソアミン類の試験法としては、欧州指令に基づく EN 12868 と ASTM F1313-90 が汎用される。EN 12868 は 11 種類の *N*-ニトロソアミン類を測定対象としており、人工唾液を用いて溶出を行い、溶出液中の *N*-ニトロソアミン量及び *N*-ニトロソ化可能物質量を測定する溶出試験である⁸⁾。*N*-ニトロソ化可能物質量とは、胃内を想定した塩酸性下で亜硝酸との反応により生成する *N*-ニトロソアミン量

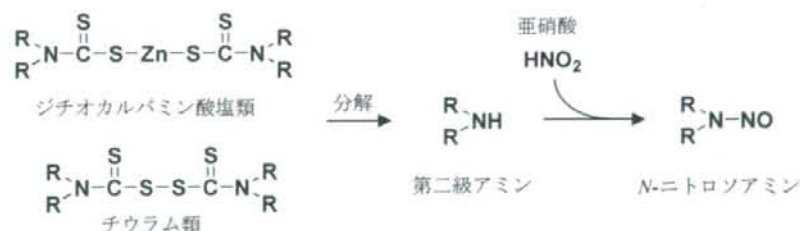


図1 加硫促進剤からの *N*-ニトロソアミン類の生成

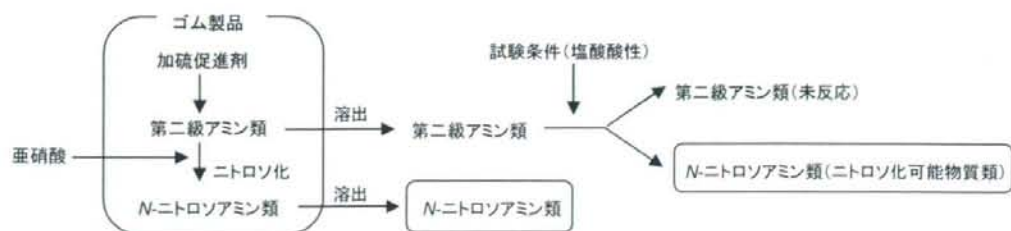


図2 EN 12868 におけるニトロソ化可能物質

を指し、溶出液中の第二級アミンの全量を指すものではない(図2)。各 *N*-ニトロソ化可能物質量は溶出液を酸性としニトロソ化させたのちの各 *N*-ニトロソアミン量から元々存在していた各 *N*-ニトロソアミン量を差し引いて算出する。

一方、ASTM F1313-90 は試料に液体窒素を加えてホモジナイズした後ジクロロメタンでソックスレー抽出して材質中の *N*-ニトロソアミン量を測定する材質試験である。

ゴム製品中の *N*-ニトロソアミン類が問題となって以来、ほ乳用乳首やおしゃぶり中の *N*-ニトロソアミン類の分析が多くの研究者により行われているが⁹⁻¹⁹⁾、いずれも上記の2種またはそれらの変法によるものである。これらの試験法では、*N*-ニトロソアミン類の検出に選択性及び感度が優れている化学発光窒素検出器(Nitrogen Chemiluminescence Detector: NCD) または熱エネルギー分析計(Thermal energy analyzer: TEA) が使用されている。しかし、この装置はわが国では汎用機器ではなく、所有する試験機関も少ない。

近年米国では NDMA を主とした *N*-ニトロソアミン類が水質汚濁物質として問題視されており、その水質調査で質量分析計(MS) や窒素リン検出器(NPD) を用いる方法も報告されている^{20,21)}。そこで、ゴム製ほ乳用乳首及びおしゃぶりの *N*-ニトロソアミン類の分析にも汎用性が高い GC/MS の適用を試みるこ

ととした。また、試験溶液の調製法としては EU の規制に対応した EN 12868 が世界的に汎用されていることから、それを準用することとし、ほ乳用乳首及びおしゃぶりの *N*-ニトロソアミン類及び *N*-ニトロソ化可能物質類の試験法を開発した。さらに、ニトロソアミン類の前駆体である第二級アミン類の LC/MS による分析法も検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

1. 試料

イソプレンゴムシート: ポリイソプレン 100 に対して酸化亜鉛 0.5、ステアリン酸 0.5、硫黄 1、ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、*N*-ペンタメチレンジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、ジベンジルジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛 0.2、*N*-オキシジエチレン-2-ベンゾチアジルスルフェンアミド 0.2 の割合で添加して製造された厚さ 2.3 mm のシート

ほ乳用乳首: 東京都内の小売店で購入したシリコンゴム製、イソプレンゴム製及び天然ゴム製ほ乳用乳首 各 1 試料

2. 試薬

1) *N*-ニトロソアミン類標準品

N-ニトロソジメチルアミン (NDMA): 純

度 98%以上、*N*-ニトロソジエチルアミン (NDEA) : 純度 98%以上、*N*-ニトロソジプロピルアミン (NDPA) : 純度 98%以上、*N*-ニトロソジブチルアミン (NDBA) : 純度 95%以上、*N*-ニトロソモルホリン (NMOR) : 純度 98%以上、*N*-ニトロソ-*N*-メチルアニリン (NMPHA) : 純度 98%以上 東京化成工業(株)製

N-ニトロソジベンジルアミン (NDBzA) : 純度 99%以上 特注品 和光純薬工業(株)製

N-ニトロソピペリジン (NPIP) : 純度 95%以上 SIGMA 社製

N-ニトロソピロリジン (NPYR) : 純度 98%以上 Aldrich 社製

N-ニトロソ-*N*-エチル-*N*-フェニルアミン (NEPhA) : 純度 98%以上 Toronto Research 社製

N-ニトロソジイソプロピルアミン (NDiPA) : 純度 95%以上 LGC Standards 社製

2) 第二級アミン類標準品

ジメチルアミン塩酸塩 (DMA) : 純度 99%以上、ジエチルアミン (DEA) : 純度 99%以上、ジプロピルアミン (DPA) : 純度 99%以上、ジブチルアミン (DBA) : 純度 99%以上、ピペリジン (PIP) : 純度 99%以上、ピロリジン (PYR) : 純度 98%以上、モルホリン (MOR) : 純度 99%以上、ジベンジルアミン (DBzA) : 純度 97%以上、*N*-メチルアニリン (MPhA) : 純度 98%以上、*N*-エチルアニリン (EPhA) : 純度 99%以上 東京化成工業(株)製

3) その他の試薬

炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム : 特級、硫酸ナトリウム : 残留農薬試験用、アセトン : 残留農薬・PCB 試験用 シグマアルドリッチジャパン社製

炭酸カリウム : 特級、亜硝酸ナトリウム :

純度 98.5%以上、ジクロロメタン : 残留農薬・PCB 試験用、ヘキサン : 残留農薬・PCB 試験用、トリフルオロ酢酸 (TFA) : 特級 和光純薬工業(株)製

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

4) *N*-ニトロソアミン類標準溶液

内標準原液 : NDiPA 10 mg をヘキサンに溶かして 100 mL としたもの (100 µg/mL)。

内標準溶液 : 内標準原液をアセトンで希釈して 0.2 µg/mL としたもの。

N-ニトロソアミン類標準原液 : *N*-ニトロソアミン類標準品各 20 mg をそれぞれアセトンに溶かして 20 mL とし、これらを各 5 mL ずつ混合し、ヘキサンで 100 mL としたもの (50 µg/mL)。

N-ニトロソアミン類標準溶液 : *N*-ニトロソアミン類標準原液に内標準原液を加え、ヘキサンで適宜希釈して *N*-ニトロソアミン類は 0.01~10 µg/mL、内標準は 0.2 µg/mL としたもの。

5) 第二級アミン類標準溶液

第二級アミン類標準原液 : 第二級アミン類標準品各 50 mg (DMA のみ塩酸塩であるため 90.6 mg) をそれぞれメタノールに溶かして 50 mL とし、これらを各 1 mL ずつ混合し水を加えて 20 mL とした (50 µg/mL)。この液を人工唾液で希釈して 0.05~5 µg/mL としたもの。

第二級アミン類標準溶液 : 各濃度の第二級アミン類標準原液 2 mL に 0.1% TFA を加えて 10 mL としたもの (0.01~1 µg/mL)。

6) 人工唾液

炭酸水素ナトリウム 4.2 g、塩化ナトリウム 0.5 g、炭酸カリウム 0.2 g、亜硝酸ナトリウム 0.03 g を水 950 mL に溶解し、0.1 mol/L NaOH で pH 9 に調整したのち水を加えて 1,000 mL としたもの。

3. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS): 6890N Network GC System、5975 inert Mass Selective Detector、Agilent Technologies 社製

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS): Acquity Series、Waters 社製

減圧遠心濃縮器: CVE-3100、東京理化工機 (株) 製

4. GC/MS 測定条件

カラム: DB-FFAP (内径 0.25 mm、長さ 15 m、膜厚 0.25 μ m) Agilent Technologies 社製、カラム温度: 50°C-10°C/min-160°C-20°C/min-250°C (2 min)、注入量: 1 μ L、注入口温度: 120°C、トランスファーライン温度: 250°C、イオン源温度: 230°C、キャリアーガス: He 1.0 mL/min (定流量)、スプリット比: 1:1、イオン化電圧: 70 eV (EI モード)、測定モード: SIM、定量イオン及び確認イオン: 表 1 に記載

5. LC/MS 測定条件

カラム: Acquity BEH C18 (100 mm \times 2.1 mm、粒径 1.7 μ m)、カラム温度: 40°C、移動相: A 0.1%TFA、B 0.1%TFA/メタノール、A : B (99 : 1) (1 min) \rightarrow 直線グラジエント (6 min) \rightarrow A : B (1 : 99) (3 min)、流速: 0.3 mL/min、注入量: 10 μ L、イオン化法: ESI (+)、キャピラリー電圧: 3 kV、イオン源温度: 150°C、脱溶媒温度: 400°C、脱溶媒ガス流量: N₂ 600 L/hr、コーンガス流量: N₂ 50 L/hr、測定モード: SIR、コーン電圧及び定量イオン: 表 2 に記載

6. 試験溶液の調製

試料約 10 g を精密にはかり、完全に浸る最少の水を用いて 10 分間煮沸した。試料を取り出したのち水を加えて 100 mL としたもの

を煮沸液とした。

試料は放冷後、縦方向に二つに切断して一晚自然乾燥させたのち、人工唾液 80 mL を加えしゃ光下 40°C で 24 時間静置した。この液を 100 mL のメスシリンダーに移し、約 10 mL の人工唾液で試料を洗浄したものと人工唾液を加えて 100 mL とし、これを溶出液とした。

煮沸液と溶出液から以下の試験溶液を調製した。

① *N*-ニトロソアミン類試験溶液: 煮沸液または溶出液 75 mL、内標準溶液 1 mL 及び 1 mol/L NaOH 2 mL を分液ロートに入れ、ジクロロメタン 20 mL を加えて振とうした。ジクロロメタン層を採取し、水層に再度ジクロロメタン 20 mL を加えて振とうした。ジクロロメタン層を合わせて硫酸ナトリウムで脱水したのち、ヘキサン 2 mL を加えて 35°C 以下で 1 mL 弱まで減圧濃縮した後、ヘキサンを加え 1 mL に定容した。

② *N*-ニトロソ化可能物質類試験溶液: 溶出液 20 mL に 1 mol/L HCl 2 mL を加えて振とうし、暗所に 30 分間放置した。分液ロートに移して内標準溶液 1 mL 及び 1 mol/L NaOH 4 mL を添加し、ジクロロメタン 10 mL を加えて振とうした。ジクロロメタン層を採取し、水層にジクロロメタン 10 mL を加えて振とうした。ジクロロメタン層を合わせて硫酸ナトリウムで脱水したのち、ヘキサン 2 mL を加えて 35°C 以下で 1 mL 弱まで減圧濃縮した後、ヘキサンを加え 1 mL に定容した。

③ 第二級アミン類試験溶液: 煮沸液または溶出液 1 mL を採り、0.1% TFA を加えて 5 mL とした。

7. 定量

1) *N*-ニトロソアミン類及びニトロソ化可能物質類

N-ニトロソアミン類及び *N*-ニトロソ化可

能物質類試験溶液は、GC/MSで測定し、ピーク面積を用いて内標準法により定量した。各試験溶液中の各*N*-ニトロソアミンの濃度から、試料量当たりの各*N*-ニトロソアミン溶出量(μg/kg)を算出した。各*N*-ニトロソ化可能物質については試験溶液から得られた総量からニトロソ化反応を行っていない各*N*-ニトロソアミン溶出量を差し引いたものを、各*N*-ニトロソ化可能物質溶出量(μg/kg)とした。

2) 第二級アミン類

第二級アミン類はLC/MSで測定し、定量イオンのピーク面積を用いて絶対検量線法により定量し、煮沸液及び溶出液中の試料量当たりの各第二級アミン溶出量(mg/kg)を算出した。

8. 添加回収試験

シリコーンゴム及びイソプレングム製ほ乳用乳首から得られた溶出液75 mL及び20 mLに10種類の*N*-ニトロソアミンを各37.5または40 ng添加し、各試験溶液の調製法に従って操作し、*N*-ニトロソアミン類及び*N*-ニトロソ化可能物質類試験法の回収率を求めた。

C. 研究結果と考察

1. 欧州規格 EN 12868 の概要

N-ニトロソアミン類の試験法のうち、国際的に最も汎用されており、今回の分析法の検討においても準拠した欧州規格 EN 12868 の試験法の概要を以下に述べる。

試料をピーカーに入れ完全に浸る最少量の水を加えて10分間煮沸する。試料を縦方向に二つに切断して一晩自然乾燥させたのち、10 g以上の試料を精密にはかり、試料10 gあたり40 mLの人工唾液を加え、40°Cで24時間穏やかに振とうする。試料を取り除き、水を加えて50 mLとしたものを溶出液とする。

溶出液を10 mL採取し1 mol/L HCl 1 mLを

加えて振とうし、暗所に30分間放置する。1 mol/L NaOH 2 mL及び内標準溶液としてNDiPA 0.2 μg/mLアセトン溶液1 mLを添加したのち、ジクロロメタンで*N*-ニトロソアミン類を抽出する。この液にヘキサン2 mLを加えて35°C以下で1 mL以下まで減圧濃縮した後、ヘキサンで1 mLに定容し*N*-ニトロソ化可能物質類試験溶液とする。

残りの溶出液に1 mol/L NaOH 1 mL及び内標準溶液1 mLを添加したのち、ジクロロメタンで*N*-ニトロソアミン類を抽出する。この液にヘキサン2 mLを加えて35°C以下で1 mL以下まで減圧濃縮した後、ヘキサンで1 mLに定容し*N*-ニトロソアミン類試験溶液とする。

各試験溶液中の*N*-ニトロソアミン類はGC-NCDで測定し、定量は0.1~0.3 μg/mLの標準溶液を用いた内標準補正を含む1点検量法により行う。各試験溶液の濃度から試料量当たりの溶出量を算出する。ただし、*N*-ニトロソ化可能物質試験溶液では*N*-ニトロソアミン類も含まれるため、各定量値から各*N*-ニトロソアミン量を差し引いたものを*N*-ニトロソ化可能物質溶出量(μg/kg)とする。各溶出量を合計したものを総*N*-ニトロソ化アミン溶出量及び総*N*-ニトロソ化可能物質溶出量とするが、研究室間の測定値のばらつきから総*N*-ニトロソアミン類溶出量では10 μg/kg、総*N*-ニトロソ化可能物質類溶出量では100 μg/kgを分析補正值とし、この数値を差し引いたものを最終的な溶出量とする。

2. 測定対象化合物の検討

EN 12868ではNDMA、NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NPYR、NMOR、NDBzA、NMPPhA、NEPhA及び*N*-ニトロソジイソニルアミン(NDiNA)の11種類を、ASTM F1313-90はそのうちNDMA、NDEA、NDBA、

NPiP、NPYR、NMOR 及び NEPhA の 7 種類を測定対象としている (表 1)。EN 12868 の 11 種類のうち NDiNA 標準品及びその前駆体であるジイソノニルアミンは市販されておらず入手ができなかった。そのため、今回の測定対象からは除外し、10 種類の *N*-ニト

ロソアミン類を測定対象とした (図 3)。さらに EN 12868 では測定していないが、*N*-ニトロソアミンの前駆体である第二級アミン 10 種類も測定法を検討し、定量することとした (表 2)。

表1 EN12868およびASTM F1313-90で試験対象とされている*N*-ニトロソアミン類

<i>N</i> -ニトロソアミン類		CAS	EN12868	ASTM F1313-90	保持時間 (min)	定量イオン	確認イオン	定量限界 (ng/mL)
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimethylamine	62-75-9	+	+	3.52	74	43	5
NDEA	<i>N</i> -nitrosodiethylamine	55-18-5	+	+	4.29	102	57	5
NDiPA	<i>N</i> -nitrosodiisopropylamine	601-77-4	IS	-	4.95	130	70	5
NDPA	<i>N</i> -nitrosodipropylamine	621-64-7	+	IS	5.84	70	130	5
NDBA	<i>N</i> -nitrosodibutylamine	924-16-3	+	+	7.89	84	158	5
NPiP	<i>N</i> -nitrosopiperidine	100-75-4	+	+	8.05	114	55	5
NPYR	<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	930-55-2	+	+	8.46	100	68	5
NMOR	<i>N</i> -nitrosomorpholine	59-89-2	+	+	9.08	116	86	5
NEPhA	<i>N</i> -nitroso <i>N</i> -ethyl <i>N</i> -phenylamine	612-64-6	+	+	10.86	121	106	5
NMPhA	<i>N</i> -nitroso <i>N</i> -methyl <i>N</i> -phenylamine	614-00-6	+	-	10.94	107	106	5
NDBzA	<i>N</i> -nitrosodibenzylamine	5336-53-8	+	-	15.98	91	181	5
NDiNA	<i>N</i> -nitrosodiisononylamine	-	+	-	*	*	*	*

IS:内標準として使用

*:定量せず

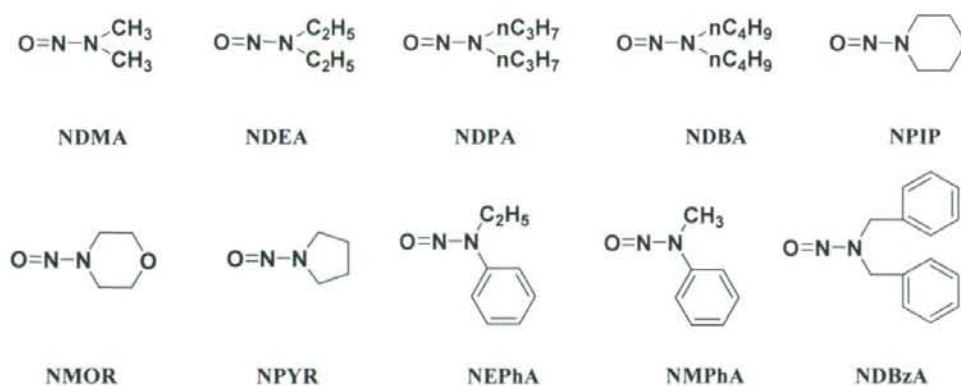


図3 測定対象とした*N*-ニトロソアミン類の構造