

E. 参考文献

- 1) 河村葉子、器具・容器包装の規格基準とその試験法 (ISBN4-8058-2663-0)、中央法規、p 32-34 (2006)
- 2) 日本薬学会編、衛生試験法・注解 2010、(ISBN978-4-307-47039-1) 金原出版株式会社、p 624-626 (2010)
- 3) 日本薬学会編、衛生試験法・注解 2010、(ISBN978-4-307-47039-1) 金原出版株式会社、p 426-428、p 630-631 (2010)
- 4) Felix J.S. et al, Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamine 6 film for meat food stuffs and cheese, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 847-857 (2008)
- 5) Felix J.S. and Nerin C., Analytical tools for identification of non-intentionally added substances (NIAS) coming from polyurethane adhesives in multilayer packing materials and their migration into food simulants, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 2869-2882 (2012)
- 6) Kraijnik V, et al, High-performance liquid chromatography of 6-caprolactam and its cyclic oligomers present in polyamide 6, *J. Chromatogr.*, 240, 539-542 (1982)
- 7) Bonifaci L. et al, Analysis of ε-caprolactam and its cyclic oligomers by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 585, 333-336 (1991)
- 8) Barkby C.T. and Lawson G., Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water, *Food Addit. Contam.*, 10, 541-553 (1993)
- 9) Begley T.H. et al, Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. *Food Addit. Contam.*, 12, 671-676 (1995)
- 10) Soto-Valdez H. et al, Determination of potential migrants present in nylon microwave and roasting bags and migration into olive oil, *Food Addit. Contam.*, 14, 309-318 (1997)
- 11) Gramshaw J.W. and Soto-Valdez H., Migration from polyamide microwave and roasting bags into roast chicken, *Food Addit. Contam.*, 15, 329-335 (1998)
- 12) Bradley E.L. et al, Method of test and survey of caprolactam migration into food packaged in nylon-6, *Food Addit. Contam.*, 21, 1179-1185 (2004)
- 13) 六鹿元雄ら、ナイロン製品からのモノマーおよび芳香族第一級アミン類の溶出、*食衛誌*、51、228-236 (2010)
- 14) Heimrich M. et al, Cyclic oligomers in polyamide for food contact material: quantification by HPLC-CLND and single-substance calibration. *Food Addit. Contam.*, 29, 846-860 (2012)
- 15) ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2 : Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (1994)
- 16) JIS Z 8402-2、測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) – 第2部 : 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的な方法 (1999)
- 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0926001 号、食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて、(平成 20 年 9 月 26 日)
- 18) Mori S., Gel permeation chromatography of the cyclic monomers and oligomers in nylon 6 and nylon 66, *J. Chromatogr.*, 49, 230-238 (1970)

F. 健康危害情報

なし

<別添2>

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）

分担研究課題
規格試験法の性能評価に関する研究

平成26年度
試験室間共同試験
計画書

ナイロン製器具・容器包装のカプロラクタム試験

平成26年5月7日

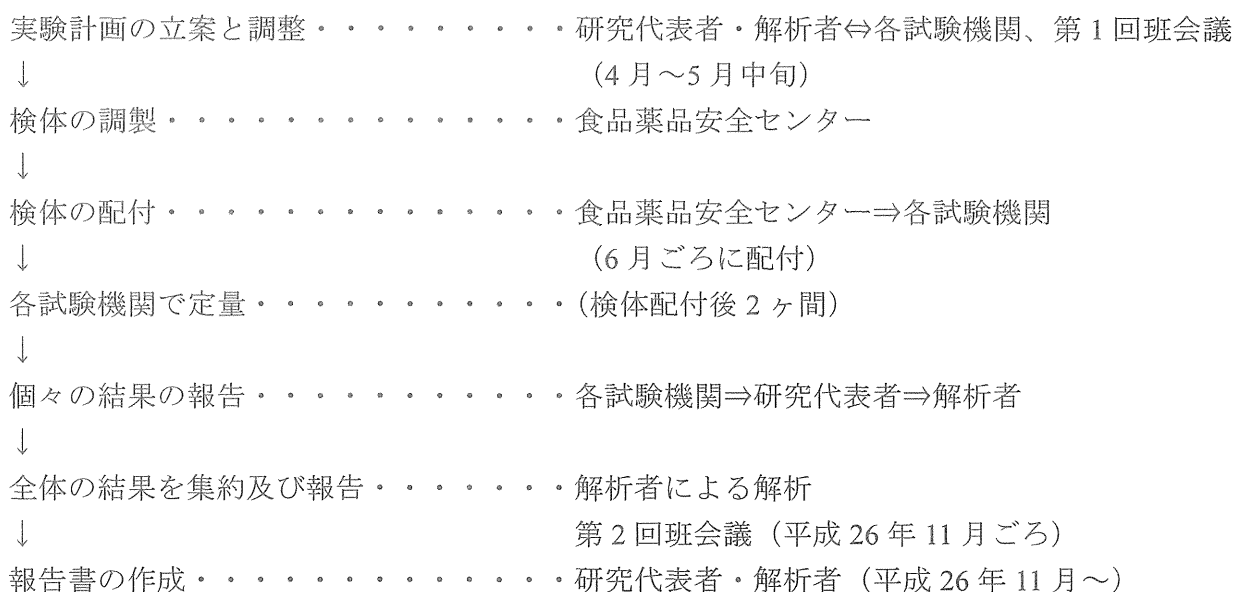
A 目的

ナイロンを主成分とする合成樹脂製の器具・容器包装ではモノマー試験としてカプロラクタムの溶出量が規制されている。その試験法は規定の溶出条件により得られた試験液中のカプロラクタムをガスクロマトグラフ・水素炎イオン化検出器（GC-FID）で測定し、得られたピーク面積カプロラクタム標準溶液（15 µg/mL）と比較して適否判定を行うこととしている。

しかし、本試験法については、これまでに試験室間共同試験は実施されておらず、規格試験としての真度や精度などの性能評価は行われていない。また近年では、ガスクロマトグラフ・質量分析装置（GC-MS）や液体クロマトグラフ・質量分析装置（LC-MS）の普及が進み、これらを用いたカプロラクタム測定法が報告されている。

そこで、ナイロン製器具・容器包装のカプロラクタム溶出試験について試験室間共同試験を行い、試験法の性能を評価するとともに、汎用性が高いガスクロマトグラフ・質量分析法（GC/MS）について、代替法としての妥当性を確認することとした。

B スケジュール



C 測定に関する要件

検体の測定は以下の要件を満たす測定法または条件により実施すること。

①試験に用いる測定法または機器は、規格試験を実施可能なものであること。

試験に用いる測定法または機器は、食品衛生法の規格試験が可能（定量下限値が規格値以下）であること。通常の業務で使用していない場合は概ね可能かどうかの判断でよいが、測定前に定量下限と検量線の確認を行うこと。

検体の測定は、通常の業務（他の化合物の試験等でもよい）で使用している機器または今後の使用が見込まれる機器を用いて行うこと。ただし、長期間使用していない機器を用いる場合は、測定前に整備及び感度等の確認を行うこと。

②試験は、その測定法に関する経験・知識を有する者またはその者から指導を受けた者が行

うこと。

経験がある者（他の化合物の測定経験でも可）による測定の実施が望ましい。

経験が無いものが測定を実施する場合は、事前に操作法などを確認しておくこと。

③検体の測定は検体受領後2ヶ月以内に実施すること。

可能であれば検体受領後1週間以内の実施が望ましい。

予定していた試験は可能な限り実施すること。

多数の測定法による試験を実施、突発的な他業務の遂行による遅延、機器の故障など、特段の事情により測定作業が遅延または試験が不可能となった場合は速やかに連絡すること。

④試験は本計画書に従って行うこと。

測定及び定量は「I 測定方法」に従って行うこと。ただし、記載のない条件等については任意とする。

⑤試験結果は研究終了後、1年間保存すること。

測定条件、検量線及び検体の測定データは平成28年3月末まで保存すること。

D 解析者

（一財）化学研究評価機構 高分子試験・評価センター・大阪事業所 渡辺 一成

【注意】研究代表者及び解析者は、本研究で知り得た各試験機関の情報・結果について守秘義務を負うものとする。また、研究代表者及び解析者本人は試験を実施しない。

E 参加機関及び機関コード

①参加機関

東京都健康安全研究センター	埼玉県衛生研究所	神奈川県衛生研究所
長野県環境保全研究所	静岡県環境衛生科学研究所	静岡市環境保健研究所
愛知県衛生研究所	名古屋市衛生研究所	大阪府立公衆衛生研究所
大阪市立環境科学研究所	さいたま市健康科学研究センター	
国立医薬品食品衛生研究所	(独) 産業技術総合研究所	
(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		
(一財) 化学研究評価機構 高分子試験・評価センター・大阪事業所		
(一財) 日本食品分析センター 多摩研究所		
(一財) 日本食品分析センター 彩都研究所		
(一財) 食品環境検査協会	(一財) 日本冷凍食品検査協会	
(公社) 日本食品衛生協会	(一財) 東京顕微鏡院	
(一財) 日本文化用品安全試験所	(一財) 日本穀物検定協会	
(一社) 日本海事検定協会	(一財) 千葉県薬剤師会検査センター	
(一財) 食品分析開発センターSUNATEC	(一財) 食品薬品安全センター	

合計 27 機関

【注意】試験を実施しない試験機関も含む

②機関コード

すべての参加機関に機関コードを交付する。

機関名と機関コードの対応は非公開とする。

機関コードにより実施する試験項目、測定法を確認する。

結果シートには機関コードのみを記載し、機関名は記入しない。

結果シートは、各機関の担当者から研究代表者を經由して解析者へ提出する。

【注意】機関コードは他機関や解析者に知られないよう注意すること。

F 各試験機関で実施する試験項目と測定法

機関コード	GC-FID	GC/MS	機関コード	GC-FID	GC/MS
A	○	○	N	○	○
B	○	×	O	○	×
C	○	×	P	○	○
D	×	○	Q	○	○
E	×	×	R	○	×
F	○	○	S	○	○
G	×	×	T	○	×
H	○	○	U	○	×
I	○	○	V	×	×
J	×	×	W	×	○
K	○	○	X	○	○
L	×	×	Y	○	×
M	○	○	Z	×	×

LC 及び LC/MS による試験を希望する試験機関は無し。

G 検体の均質性及び安定性の確認

①均質性確認

国立医薬品食品衛生研究所にて、各検体 10 検体を検体受領直後に公定法により測定し、その定量値を用いて確認する。

②安定性確認

国立医薬品食品衛生研究所にて、検体を受領した約 2 ヶ月後に均質性確認と同様に測定し、内標準法による定量値を用いて確認する。

H 検体の配付及び保管

①検体配付時期の連絡

検体の配付予定時期は約 1 ヶ月前に、発送日はその 1 週間前に参加機関に連絡する。各試験機関は検体保管場所の確保、必要な器具類の購入、装置の動作確認、試薬の購入、標準原液の調製等の準備を適宜行うこと。

②配付する検体

カプロラクタムの 20%エタノール溶液、3 検体（各 10 mL）、ブランク溶液（各 10 mL）

③検体の確認

セット数、検体数、溶媒・検体 No の判別、液漏れの有無を確認し、問題があれば至急連絡すること。

④検体の保管及び管理

検体は冷蔵庫内で保管する。

【注意】試験操作は、検体を室温まで戻してから行うこと。

⑤検体の不足

何らかの事情により検体が不足して予定する試験が不可能となった場合は速やかに研究代表者に連絡すること。

I 検体の測定及び定量

①測定溶液の調製

1 検体から 2 つの測定溶液を調製する。

検体を希釈して測定する場合の希釈溶媒の種類及び希釈倍率は任意とする。

内標準はヘプタラクタムを用い、その添加方法及び濃度は任意とする。

測定溶液…検体を測定または定量可能な状態としたもの（希釈、バイアルへの分注等）

【注意】ヘプタラクタムは国立医薬品食品衛生研究所で購入して配布する。

②測定条件等

GC-FID（公定法）の場合

食品衛生法に準拠して測定する。ただし、内標準の添加に関する操作はこの限りでない。食品衛生法で規定されていない条件は任意とする。

GC-FID（公定法変法）の場合

公定法で規定されている GC-FID の操作条件を変更したものを用いる。変更する操作条件は任意とする。ただし、検出器は FID を用いる。

GC/MS の場合

GC-MS を用いて測定する。すべての条件は任意とする。

③定量範囲

検体中のカプロラクタム 1.5～30 µg/mL を定量可能な範囲で検量線を作成する。

定量に用いる検量線は 3 点以上の濃度点数により作成する。濃度及び間隔等は任意とする。ただし、規格値の濃度点（検体当たり 15 µg/mL）は必ず含むこととする。

定量範囲の濃度を測定するために複数の検量線を用いてもよい。（低濃度と高濃度で検量線を分けて定量してもよい）

定量下限値が定量範囲に含まれる場合は、定量下限値を検量線の最低濃度としてよい。

定量上限値が定量範囲に含まれる場合であって、検体の濃度が定量上限値を超える場合は検体を適宜希釈して定量する。

④定量

測定法ごとに1検体につき2回の測定及び定量を行い、それぞれの定量値を報告する。

【注意】1検体から2つの測定溶液を調製して測定する。同じ測定溶液を2回測定するわけではない。

【注意】適切な状態で測定または定量が行われていないと判断でき、その原因が明らか場合は再測定または再定量を行う。

定量は絶対検量線法と内標準法で行う。同じ測定結果を用いてそれぞれの定量値を求めてもよい。

報告する定量値は検体の濃度（測定溶液の定量値ではない）とする。

希釈して測定する場合は、原則として検体と同じ溶媒を用いて希釈する。

検量線、検体の測定順、洗浄用サンプルや校正用サンプルの測定の有無は任意とする。

検体の濃度が検量線の濃度範囲（または定量下限値）よりも低い場合は、濃縮して測定する必要はない。この場合、定量値は「<0.1」（0.1は定量下限値）のように記載して報告する。

定量値は3桁の数値を報告する。（4桁目を四捨五入、機器の精度、有効数字等を考慮する必要はなく、検量線と希釈倍率から算出された濃度でよい）

【注意】mg/mLの単位で定量すると、小数点以下の濃度となるため、解析ソフトによっては2桁しか表示されない場合がある。また、検量線の近似式の傾き及び切片の桁数にも注意し、これらの桁数が3桁以上であることを確認する。十分な桁数が得られない場合はμg/mL単位で検量線を作成するとよい。

⑤適否の判定

測定または定量結果から各検体が食品衛生法に適合しているか否かを以下の2つの方法で判定する。

濃度…定量値による判定

ピーク…カプロラクタム標準溶液（または規格値相当濃度のカプロラクタム溶液）と検体のピーク面積の比較による判定

【注意】ピーク面積比（内標準法）ではなく、ピーク面積（絶対検量線法）で比較を行う。

⑥選択性の確認

方法は特に指定しない。通常実施している確認法があればその方法を用いてよい。確認法及び得られた知見があればその内容を報告する。

J 結果の報告

報告シート3は測定法ごとに記入する。（報告シートへの記入例を【参考】に示す）

測定中に機器のトラブル等の問題が発生した場合は必ず記載すること。

諸事情により期限までに報告できない場合は事前に連絡すること。

その他、不明な点があれば可能な限り試験実施前に連絡すること。

試験終了後は速やかに結果等を報告シートに記入し、電子ファイル（E-mail）にて研究代表者へ提出する。さらに後日、結果報告書として書面にて研究代表者に提出する。

【報告シートの内容】

報告シート1…測定機器、試薬等の情報、感想など

報告シート2…定量結果

K 目標値

食品衛生法の規格試験としての妥当性を評価するにあたり、各性能パラメーターに対して下記の目標値を設定する。

選択性：妨害となるピーク等が検出されないこと

真度：80～110%

併行精度：10%以下

室間再現精度：25%以下

【参考】

H26「カプロラクタム試験」結果報告シート1

(検体・機器・試薬の情報)

1. 試験コード、検体及び測定法

機関コード *1	セットNo. *2	測定法 *3
T	1	GC-FID(変)
	3	GC/MS

2. 使用した機器

機器 *4	メーカー	型式	開示の可否 *5	
GC-FID	Agilent technologies	6890	可	
			一部可	クロマトのみ不可
			否	

3. 使用した試薬

試薬 *6	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
カプロラクタム	和光純薬	特級	>99.5%
エタノール			
水		MilliQ	
ヘリウムガス	-	純ヘリウム	99.9999%
窒素ガス			

4. 検体の保存

検体の保存方法	冷蔵庫内で保管
---------	---------

5. 試験全体に対する感想・コメントなど

--

H26「カプロラクタム試験」結果報告シート2

(測定条件)

機関コード T

1. 測定条件①

測定法 *7	GC-FID(変法)		
カラムの種類、サイズ *7	DB-1, 30m, 0.32mm, 5µm		
キャリアーガス	He		
カラム温度 *7			
キャリアーガス(移動相)の流量	1.0 mL/min(定圧)		
注入口温度 *7	240℃	検出器温度 *7	240℃
その他の条件 *8	メイクアップガス: N2		
内標準物質名	ヘプタラクタム	測定時の内標準濃度	15 µg/mL
内標準の添加方法	検体10 mLにヘプタラクタム溶液(1 mg/mL)を150 µL添加		

2. 測定条件②*9

測定法 *7			
カラムの種類、サイズ *7			
キャリアーガス			
カラム温度 *7			
キャリアーガス(移動相)の流量			
注入口温度 *7		検出器温度 *7	
その他の条件 *8			
内標準物質名	ヘプタラクタム	測定時の内標準濃度	
内標準の添加方法			

H26「カプロラクタム試験」結果報告シート3*10

(定量結果)

機関コード T セットNo 1 測定法 GC-FID(変)

受領日 5/10 測定日 5/26

1. 定量結果

検体No	1		2		3	
定量値 (μg/mL) (絶対) *11	12.3	11.5	8.23	7.56	16.7	17.2
定量値 (μg/mL) (内標) *11	12.3	11.9	8.00	8.03	15.2	15.1
使用した検量線 *12	1	1	1	1	1	1
適否判定 (濃度) *13	適	適	適	適	否	否
適否判定 (ピーク) *14	適	適	適	適	適	適
検体の希釈倍率 *15	1	1	1	1	1	1

2. 対象物の検出条件

成分	保持時間	定量用イオン *16	確認用イオン *16
カプロラクタム	5.21		
ヘプタラクタム	6.53		

3. 検量線情報

検量線①

濃度点 (μg/mL)	0, 5, 10, 15, 20, 30 (6点)		回数 *17	前後2回
定量下限 (μg/mL) *18	5 μg/mL		形状	1次直線
回帰式 (検量線式)	(絶対)	$y=2.354x+0.0255$	残差 *20	
	(内標)	$y=2.354x+0.0255$	残差 *20	
相関係数 (R) *19	(絶対)	0.99952	(内標)	0.99953

検量線② *21

濃度点 (μg/mL)		回数 *17	
定量下限 (μg/mL) *18		形状	
回帰式 (検量線式)	(絶対)		残差 *20
	(内標)		残差 *20
相関係数 (R) *19	(絶対)		(内標)

4. その他

選択性の確認方法及びその知見
気になった点、測定中のトラブルなど

- *1 コードのみを記入、機関名は記入しない
- *2 検体に記載のセット番号を記入
- *3 1セットにつき1測定法で定量する
- *4 測定に使用した機種すべてを記入。
- *5 開示してもよいかどうか条件があれば記載
- *6 他に使用した試薬があれば行を追加して記入
- *7 公定法と同じであっても記入する。
- *8 その他のパラメーター名とその数値を記入。必要な項目については後日確認するので、代表的なパラメーターのみでよい。
- *9 複数の測定法で行う場合のみ使用。3つ以上の場合はシートをコピーして作成
- *10 測定法ごとに別シートとして作成する。
- *11 検体当たりの濃度を記入。3桁（4桁目を四捨五入）
- *12 3. 検量線情報の検量線番号を記入
- *13 定量値（絶対法）より適否判定を行った際の判定結果を記入
- *14 ピーク面積により適否判定を行った際の判定結果を記入
- *15 そのまま測定した場合は『1』、10倍希釈して測定した場合は『10』
- *16 GC/MS の場合のみ記入
- *17 検量線を作成するための標準溶液の測定回数
- *18 定量下限は、S/N などから判断。厳密な数値を求める必要はない
- *19 R2 ではなく R で記入。3桁以上記入
- *20 検量線の残差は、ソフトで自動的に検量線を計算している場合、「s²」「Se」「SRES²」などという表記で記載されることが多い。不明であれば記入しなくてもよい。
- *21 濃度範囲で検量線を分けた場合に使用する。1つの検量線ですべての検体を定量した場合は不要

市販製品に残存する化学物質に関する研究

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

研究要旨

器具・容器包装及び玩具（以下、器具・容器包装等）は合成樹脂、ゴム、金属など多種多様な材質で製造され、製品には原料や添加剤等の様々な化学物質が残存する可能性がある。これらの化学物質は食品や唾液を介してヒトに暴露される可能性があることから、器具・容器包装等の安全性を確保するためには製品に残存する化学物質の残存量及び溶出量を把握する必要がある。しかしながら、規格基準が設定されていない物質については、分析法が確立されていないものや残存量・溶出量等の実態が明らかでないものが多い。また、試験法や分析法の中には問題を有するものがある。そこで本年度は、植物油総溶出物量試験法の改良、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ーガスの変更による影響及びアンチモン（Sb）及びゲルマニウム（Ge）溶出試験における ICP-OES を用いた代替試験法の開発に関する研究を行った。

合成樹脂及びゴム製器具・容器包装のうち、油脂及び脂肪性食品と接触して使用される製品の総溶出物量試験である植物油総溶出物量試験法について改良を行った。この試験法のもととなったオリブ油総溶出物量試験法は、欧州連合の合成樹脂製器具及び容器包装の規格試験法として採用されており、試験法は欧州標準規格 EN 1186-2 に記載されている。しかし、試験法は極めて煩雑で長時間を要し、しかも有害試薬を使用するなど問題が多い。そこで、昨年度は試料の恒量化と植物油のメチルエステル化について検討した。今年度は試料中の残存植物油の抽出法について検討を行った。その結果、内標準を加えたシクロヘキサンに浸漬し、40℃で 120 分間の振とう抽出を 1 回行うという簡便な抽出法で、残存植物油量を求められることを明らかにした。以上の検討結果をもとに、操作が簡便でしかも有害試薬を使用しない植物油総溶出物量試験法の改良法を確立した。さらに、本試験法と EN 法の同等性を検証するため、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニル、シリコーンゴム及び天然ゴムの 6 種類の材質について、両試験法により植物油総溶出物量試験を行った。その結果、両試験法により得られた植物油総溶出物量及びその標準偏差は極めて良く一致し、改良法は EN 法と同等の試験法であることが確認された。

食品衛生法における器具・容器包装の規格試験のうち、GC-FID 及び GC-NPD を用いる試験法について、キャリアーガスとして He 及び N₂ を用い、同一装置、同一条件で測定を行い、キャリアーガスの違いによる影響を確認した。GC-FID を用いる揮発性物質、塩化ビニル、塩化ビニリデン、メタクリル酸メチル、カプロラクタム及びエピクロルヒドリン試験

においては、N₂ をキャリアガスとして用いると揮発性物質試験ではピークのテーリングが、カプロラクタム試験ではピークのリーディングが認められたが、適否判定に支障をきたすほどの変化ではなかった。一方、塩化ビニル、塩化ビニリデン、メタクリル酸メチル及びエピクロルヒドリン試験では、キャリアガスによる違いは認められなかった。これらの試験法においては、いずれのキャリアガスを用いても規格試験法として十分な性能が得られた。一方、GC-NPD を用いるアミン類試験では、キャリアガスに N₂ が規定されていない。この試験法ではキャリアガスの変更による各成分の保持時間の変化はなく、いずれにおいても性能パラメーターの値は目標値を満たしており、代替試験法として N₂ キャリヤガスが適用可能であった。しかし、ベースラインの形状が変化し、ブランク溶液ではトリエチルアミンの保持時間付近に複数のピークが認められたことから、慎重に定性を行う必要があった。

公定法によるアンチモン (Sb) 及びゲルマニウム (Ge) 試験において、ICP-OES を用いると半数以上の試験機関で装置の定量下限値が高く、試験することができない。そこで、代替法として、試験溶液を濃縮して測定する蒸発乾固法及びキレート法、試験溶液に Sb 及び Ge を添加し定量可能な濃度として測定する標準添加法及び既知量添加法について検討し、その適用性を検証した。試験溶液を蒸発させて乾固する蒸発乾固法では、Sb 及び Ge の揮散を防ぐ方策を見出すことができなかった。試験溶液中の Sb 及び Ge をキレート繊維に吸着させて濃縮するキレート法は代替法として十分な性能を有していたが、公定法では使用していないキレート繊維や試薬・試液が必要であった。また、これらの試験溶液を濃縮する方法に共通する問題点として、試験溶液中の Sb 及び Ge の化学形態によっては回収できない場合があると考えられた。一方、試験溶液に Sb 及び Ge を添加し定量可能な濃度として測定する標準添加法及び既知量添加法は代替法として十分な性能を有していた。これらは特別な試薬や装置を必要とせず、大部分の試験機関で実施することが可能なため代替法として有用であると考えられた。ただし、標準添加法は共存物質の影響を考慮する必要がないが、バックグラウンド補正が不適切であった場合は正確な定量値が得られないため、測定条件の設定を慎重に行う必要があった。既知量添加法は公定法と同様に標準溶液と試験溶液の発光強度を比較して適否判定を行うことができるが、内標準法を用いる場合はその発光強度の安定性にも注意を払う必要があった。

研究協力者

河村葉子：国立医薬品食品衛生研究所
中西 徹：(一財) 日本食品分析センター
渡邊雄一：(一財) 日本食品分析センター
城市 香：(一財) 日本食品分析センター
川口寿之：(一財) 日本食品分析センター
羽石奈穂子：東京都健康安全研究センター
田中秀幸：(独) 産業技術総合研究所
城野克広：(独) 産業技術総合研究所
穉山 浩：国立医薬品食品衛生研究所
阿部 孝：(一財) 日本食品分析センター
阿部智之：(公社) 日本食品衛生協会
石原絹代：(一財) 日本食品分析センター
伊藤禎啓：(公社) 日本食品衛生協会
大坂郁恵：埼玉県衛生研究所
大野春香：愛知県衛生研究所
大野浩之：名古屋市衛生研究所
大野雄一郎：(一財) 千葉県薬剤師会
検査センター
大坪昌広：静岡県環境衛生科学研究所
大畑昌輝：(独) 産業技術総合研究所
大森清美：神奈川県衛生研究所
荻本真美：東京都健康安全研究センター
尾崎麻子：大阪市立環境科学研究所
柿原芳輝：(一財) 日本穀物検定協会
神邊友宏：静岡市環境保健研究所
菊地 優：東京都健康安全研究センター
岸 映里：大阪市立環境科学研究所
小林 尚：(一財) 食品分析開発センター
SUNATEC
近藤貴英：さいたま市健康科学研究
センター

齋藤敬之：(一財) 食品環境検査協会
櫻木大志：名古屋市衛生研究所
柴田 博：(一財) 東京顕微鏡院
清水 碧：神奈川県衛生研究所
鈴木公美：東京都健康安全研究センター
清木達生：(一社) 日本海事検定協会
関戸晴子：神奈川県衛生研究所
菌部博則：(一財) 日本文化用品安全試験所
高坂典子：(一財) 食品薬品安全センター
竹内温教：(一財) 食品分析開発センター
SUNATEC
竹中 佑：(一財) 日本文化用品安全試験所
但馬吉保：(一財) 食品環境検査協会
田中 葵：(一社) 日本海事検定協会
外岡大幸：さいたま市健康科学研究
センター
富田浩嗣：愛知県衛生研究所
早川雅人：(一財) 化学研究評価機構
原 貴彦：(一財) 食品環境検査協会
疋田晃典：長野県環境保全研究所
平川佳則：(一財) 食品環境検査協会
松山重倫：(独) 産業技術総合研究所
三浦俊彦：(一財) 日本冷凍食品検査協会
水野会美：(一財) 食品分析開発センター
SUNATEC
村上 亮：(公社) 日本食品衛生協会
山口未来：国立医薬品食品衛生研究所
若山貴成：名古屋市衛生研究所
渡辺一成：(一財) 化学研究評価機構

健康危害情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 講演、学会発表等

- 1) 阿部 裕ら：GC/MS を用いたフタル酸エステル測定における共存可塑剤の影響、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会 (2014. 11)
- 2) 中西 徹ら：植物油総溶出量試験法の改良 その 1 植物油定量法、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014. 12)
- 3) 城市 香ら：植物油総溶出量試験法の改良 その 2 試料の恒量化、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014. 12)
- 4) 阿部 裕ら：LC/MS/MS を用いたポリ塩化ビニル中のフタル酸エステル分析法、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014. 12)

知的財産権の出願・登録状況

なし

＜その1＞ 植物油総溶出物量試験法の改良 植物油抽出法の検討及び改良試験法の検証

研究協力者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 中西 徹、渡邊 雄一、城市 香、川口 寿之
(一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

オリブ油総溶出物量試験 (Overall Migration Test into Olive Oil) は、器具・容器包装などの食品接触物質からの溶出物の総量を測定する試験 (Overall Migration Test、我が国の蒸発残留物試験にほぼ相当) の一つであり、油脂及び脂肪性食品に使用される食品接触物質に適用される。欧州連合では規格試験として採用され、その試験法は欧州標準規格 EN 1186-2 (EN 法)¹⁾ に記載されている。

オリブ油総溶出物量試験は合成樹脂やゴム製器具・容器包装の油脂及び脂肪性食品への溶出傾向を明らかにし、またそれらに対応する蒸発残留物試験の代替溶媒や試験条件を設定するために必須である。平成 19～21 年度厚生労働科学研究「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」及び平成 22～24 年度厚生労働科学研究「食品用器具・容器包装及び乳幼児用玩具の安全性向上に関する研究」において、油脂及び脂肪性食品用の合成樹脂及びゴム製器具・容器包装の蒸発残留物試験の見直しを行い、EN 法を用いてオリブ油総溶出物量を求め、それをもとに適切な代替溶媒及び試験条件の設定を行った。

しかし、EN 法は操作が極めて煩雑で長時間を要し、試験には熟練した技術が求められる。しかも、有害試薬である三フッ化ホウ素メタノールを使用する。そのため、我が国では実施できる試験機関が限られている。

そこで本研究では、EN 法をもとに、より

精度が高く、安全で、しかも簡便な試験法に改良し、多くの試験機関で実施できる試験法として確立することを目的とした。一方、試験にはオリブ油以外の植物油も使用することから、試験法の名称を植物油総溶出物量試験法に変更し、オリブ油以外の植物油も使用可能であることを明確にした。

昨年度の本研究では、植物油総溶出物量試験法のうち試料の恒量化及び試料中に残存する植物油の定量法について検討を行った。試料の恒量化では、43%硫酸デシケーター (温度 20℃、相対湿度 50%) を用いて試料を安定化することにより、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、シリコーンゴム、天然ゴムのいずれの試料でも、短時間で恒量化することができた。また、試料中に残存する植物油の定量法では、ガスクロマトグラフィーの測定条件を検討するとともに、メチルエステル化法として、還流下での煩雑な操作や有害試薬を用いる三フッ化ホウ素メタノール法からナトリウムメトキシド法への変更を検討し、有害試薬を用いずしかも室温下での簡便な試験法を確立した。

今年度は、ガスクロマトグラフィーによる植物油メチルエステル体測定時の定量限界及び検量線についてさらに検討を行った。さらに、溶出操作後の試料中に残存する植物油の抽出法について検討を行い、簡便な抽出条件を見出した。これにより改良法の全操作を確立した。そこで、今回確立した改良法と EN 法を用いて各種試料の植物油総溶出物量を求

め、これらの同等性について検証した。これらの研究成果について報告する。

B. 研究方法

1. 試料

市販のポリエチレンシート（厚さ 0.1 mm）、ポリプロピレンフィルム（厚さ 0.03 mm）、ポリ塩化ビニルフィルム（厚さ 0.009 mm）、ナイロンシート（厚さ 0.3 mm）、シリコンゴムシート（厚さ 0.5 mm）、天然ゴムシート（厚さ 0.5 mm）の 6 試料

2. 試薬及び試液

95%硫酸、水酸化カリウム、硫酸ナトリウム：試薬特級、小宗化学薬品(株)製

43%硫酸：水 547 g に 95%硫酸 453 g を少量ずつ混和して調製した。

オリーブ油：和光純薬工業(株)製

サフラワー油：リノール酸 71%、オレイン酸 16%、Sigma-Aldrich 社製

シクロヘキサン、ヘプタン、酢酸：特級、関東化学(株)製

ヘキサン、エタノール(99.5)、メタノール：残留農薬試験・PCB 試験用（5000 倍濃縮）、関東化学(株)製

ペンタン：鹿特級、関東化学(株)製

ナトリウムメトキシド溶液：28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液、和光純薬工業(株)製

トリヘプタデカノイン：純度 99%以上、Sigma-Aldrich 社製

内標準溶液：トリヘプタデカノイン 200 mg に抽出溶媒と同じ溶媒を加えて溶解し、100 ml に定容した（濃度 2 mg/ml）。

三フッ化ホウ素メタノール溶液：14%三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液、和光純薬工業(株)製

水酸化カリウムメタノール溶液：水酸化カ

リウム 11 g をメタノールに溶解して 1000 ml に定容した（濃度 11 g/L）。

飽和硫酸ナトリウム溶液：硫酸ナトリウム 200 g に水 800 ml を加え、約 70°C で加温溶解後冷却し上清を用いた。

3. 器具及び装置

硫酸デシケーター：43%硫酸を入れ 20±1°C で平衡状態にしたデシケーター（相対湿度 50±2%）

電子天秤：XS204 または XSE204（いずれも最小表示 0.1 mg）、以上メトラー・トレド(株)製

恒温振とう水槽：T-N22S、トーマス科学器械(株)製

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（GC-FID）：6890N、Agilent Technologies 社製

4. 植物油総溶出物量試験法

1) 改良法

① 予試験

試料（10 cm×10 cm または所定のサイズ）を用いてあらかじめ以下の⑤～⑦の操作を行い、ガスクロマトグラム上に植物油の定量を妨げるピークが存在しないことを確認した。植物油としてオリーブ油を使用し、その定量用ピークにはオレイン酸メチルを用いた。ただし、試料由来の妨害ピークにより定量できない場合には、植物油としてサフラワー油を用い、定量用ピークにはリノール酸メチルを用いた。

② 溶出前の試料恒量の測定

試料（10 cm×10 cm、表面積 200 cm²）は質量を測定し、硫酸デシケーターに静置した。24 時間以上間隔をあけて試料を取り出し、質量を測定して前回測定した質量との質量差を求めた。質量差が 0.5 mg 以下になるまでこの

操作を繰り返し、最後に得られた質量を溶出前の試料恒量 (W_a mg) とした。ただし、天然ゴムの抽出法の検討及び検証では $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ の試料 (表面積 18 cm^2) を使用した。

③ 植物油への溶出

試料の表面積 1 cm^2 あたり 2 ml の植物油を所定温度に加温して試料を浸漬し、所定温度に保ちながら所定時間静置したのち試料を取り出した。今回の試験法の検証では、植物油としてオリブ油 (ポリ塩化ビニルはサフラワール油) を用いた。その後、試料に付着した植物油をろ紙、キムワイプなどで除去し、さらに試料をろ紙などに挟んで約 10 kg の重しをのせ数時間静置する操作を、ろ紙などに植物油が付着しなくなるまで繰り返した。

なお、今回の検討では、溶出条件として、シリコーンゴム及び天然ゴムは 60°C 30 分間、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンは 80°C 60 分間、ポリ塩化ビニルは 40°C 30 分間を用いた。

④ 溶出後の試料恒量の測定

植物油を十分に除去した試料は、質量を測定し硫酸デシケーターに静置した。②溶出前の試料恒量の測定と同様に操作し、最後に得られた質量を溶出後の試料恒量 (W_b mg) とした。

⑤ 試料中の残存植物油の抽出

試料を広口びんに入れ、シクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加えて密栓した。 40°C の恒温振とう水槽で振とうしながら 120 分間抽出した。抽出液をナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮し窒素気流下で乾固した。

⑥ 植物油のメチルエステル化

残渣にヘプタン 10 ml を加えて溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 0.5 ml 及びメタノール 2 ml を加え、室温で 15 分間緩やかに振とうした。これに水 5 ml 及び酢酸 0.5 ml を加え

て振とうしたのち静置した。

⑦ 植物油の定量

ヘプタン層を GC-FID に注入し、得られたガスクロマトグラムから植物油の定量用ピークと内標準ピークの面積を求め、内標準法により試料中に残存する植物油量 (W_c mg) を求めた。検量線は植物油 ($0\sim 1500\text{ mg}$) に内標準溶液 10 ml を加えて⑥及び⑦の操作を行って作成した。

GC-FID 測定条件

カラム : Polyethylene glycol 系 ($0.25\text{ mm i.d.} \times 30\text{ m}$, 膜厚 $0.5\text{ }\mu\text{m}$)

カラム温度 : 100°C (2 min), $100\sim 250^\circ\text{C}$ ($20^\circ\text{C}/\text{min}$, 昇温), 250°C (5 min)

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 250°C

スプリット比 : $1:50$

キャリアガス流量 : ヘリウム $2.0\text{ ml}/\text{min}$

検出器 : 水素炎イオン化検出器 (FID)

⑧ 植物油総溶出物量の算出

植物油総溶出物量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は下式により算出した。ただし、 S は試料の表面積 (cm^2) とした。

$$\text{植物油総溶出物量} = \frac{W_a - (W_b - W_c)}{S} \times 1000$$

$$= \frac{W_a - W_b + W_c}{S} \times 1000$$

2) EN 法

EN 1186-2 に準じた。試料は 1) 改良法の①～④と同様に操作して W_a 及び W_b mg を求めたのち、以下の操作を行った。

⑤ 試料中の残存植物油の抽出

試料を細切しソックスレー抽出器に入れ、ナスフラスコに内標準溶液 10 ml 及びペンタン 200 ml を加え 7 時間抽出した。抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素気流

下で乾固した。上記の抽出操作を植物油が定量限界以下になるまで繰り返した。

⑥ 植物油のメチルエステル化

乾固した残渣にヘプタン 10 ml を加えて溶解し、水酸化カリウムメタノール溶液 10 ml を加え、冷却管を付けて 10 分間還流した。冷却管の上部から三フッ化ホウ素メタノール溶液 5 ml を加え 2 分間還流した。冷後、飽和硫酸ナトリウム溶液 20 ml を加えて 5 分間振とうし、50 ml ネスラー管に移し静置した。

⑦ 植物油の定量

1) 改良法の⑦と同様の条件でガスクロマトグラフィーを行い、内標準法で試料中の残存植物油量 (W_c , mg) を求めた。

⑧ 植物油総溶出物量の算出

1) 改良法の⑧と同じ式を用いて植物油総溶出物量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を算出した。

5. 試料中の残存植物油の抽出法の検討

1) 抽出試験用試料の調製

試料は 10 cm×10 cm (天然ゴムは 3 cm×3 cm) に切断し、4. 1) ②～④に従い抽出試験用試料を調製した。試料は検体ごとに溶出前の試料恒量 (W_a , mg)、溶出後の試料恒量 (W_b , mg) を求め、溶出前後の質量差 ($W_b - W_a$, mg) を算出した。調製した試料は質量差の分布がほぼ同等になるように 3 検体ずつ 1 組とし、抽出条件の比較に用いた。ただし、抽出溶媒の検討は 1 検体ずつのため、得られたオリブ油濃度を溶出前後の質量差 ($W_b - W_a$, mg) で補正した。

植物油への溶出において、植物油としてポリ塩化ビニルはサフラワー油、それ以外の試料はオリブ油を用いた。また溶出条件は、シリコーンゴム及び天然ゴムは 60°C30 分間、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンは 80°C60 分間、ポリ塩化ビニルは 40°C30 分間とした。

2) シリコーンゴムの抽出条件の検討

① 抽出溶媒

シリコーンゴムの抽出試験用試料に、ヘキサン、ヘキサン:エタノール(95:5)またはシクロヘキサン 190 ml と内標準溶液 10 ml を加えて、40°Cで振とう抽出を行った。なお、ヘキサンは 60°Cでも行った。0、60、120、240 及び 360 分後に抽出液を各 4 ml 採取し、絶対検量線法で抽出液中のオリブ油濃度を定量した。

② 抽出時間

シリコーンゴムの抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml と内標準溶液 10 ml を加えて、40°Cで振とう抽出を行った。0、15、30、60、120、240 及び 360 分後に抽出液を各 4 ml 採取し、絶対検量線法および内標準法によりオリブ油量を定量した。

③ 抽出回数

シリコーンゴムの抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加え 40°C120 分間振とうして抽出液を全量採取したのち、新たなシクロヘキサン 200 ml を用いて 40°C60 分間の振とう抽出をさらに 3 回繰り返した。1～4 回目の各抽出液、1 回目と 2 回目を合わせた抽出液、1～3 回目を合わせた抽出液中のオリブ油量を絶対検量線法により定量した。また、1 回目の抽出液と各混液については内標準法でも定量した。

3) その他の材質試料の抽出条件の検討

シリコーンゴム以外の材質の抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加え、以下 2) ③と同様に操作した。ただし、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニルの追加抽出は 2 回とし、1～3 回目を合わせた抽出液は測定しなかった。

6. 改良法と EN 法の同等性の検証

ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、

ポリ塩化ビニル、シリコーンゴム及び天然ゴム製の6種類の試料各3検体を用いて、4. 1) に示した改良法及び4. 2) に示したEN法に従って操作した。検体ごとに溶出前後の質量差 ($W_b - W_a$ mg)、試料中に残存する植物油量 (W_c mg)、試料あたりの溶出物量 ($W_a - W_b + W_c$ mg) 及び植物油総溶出物量を求め、それぞれの値の平均値と標準偏差を比較して同等性を検証した。

C. 研究結果及び考察

1. 植物油の定量限界及び検量線の検討

1) オリーブ油の定量限界と検量線

昨年度は 0.5~1500 mg のオリーブ油をメチルエステル化し、主脂肪酸であるオレイン酸のメチルエステル体 (オレイン酸メチル) を定量用ピークとして絶対検量線法で検量線を作成した。その結果、全範囲で極めて良好な直線性が得られ、定量限界を 0.5 mg とした。

しかし、そのガスクロマトグラムからはさらに低濃度でも定量可能と推測された。

そこで、定量限界を再検討するためにオリーブ油 0、0.05、0.1 及び 0.5 mg をメチルエステル化して GC-FID で測定した (図 1)。昨年度定量限界としたオリーブ油 0.5 mg ではオレイン酸メチル (保持時間 11.0 分) の S/N 比は 100 以上であった。一方、オリーブ油 0.1 及び 0.05 mg では、S/N 比は約 20 及び 10 でピーク形状も良好であった。また、ブランクに妨害は認められなかった。そこで、S/N 比約 10 のオリーブ油 0.05 mg を定量限界とした。

次に、オリーブ油 0.05~1500 mg に内標準を加えて測定を行い、絶対検量線法及び内標準法により検量線を作成した (図 2)。検量線は両法とも極めて良好な直線性を示した。なかでも、内標準法の R^2 は 0.9999 であり、絶対検量線法の 0.9974 よりさらに良好な直線性を示した。

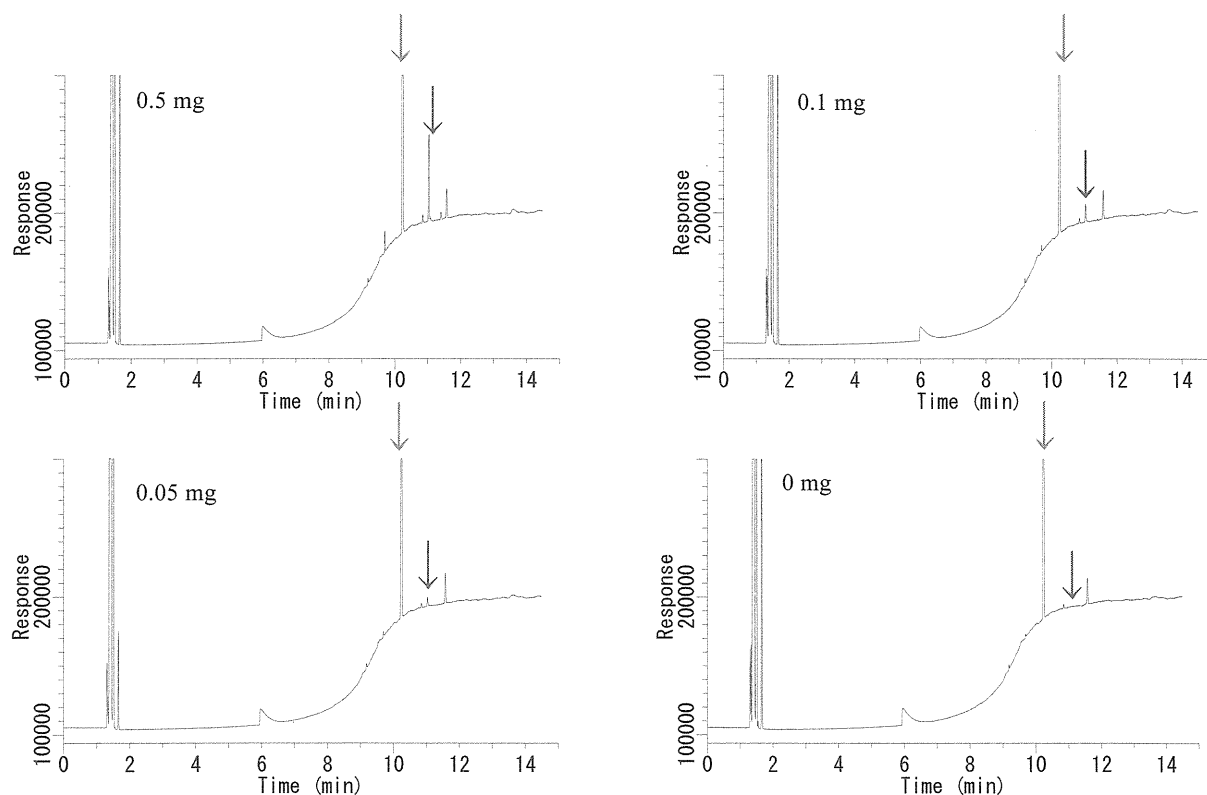


図 1 オリーブ油 (0, 0.05, 0.1 及び 0.5 mg) のガスクロマトグラム

保持時間：内標準 10.2 min, オレイン酸メチル 11.0 min