

<その1> 植物油総溶出物量試験法の改良 改良試験法の試験室間共同試験

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 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

合成樹脂やゴム製器具・容器包装からの総溶出物量試験として、食品衛生法では蒸発残留物試験を規定しており、浸出用液として、一般食品は水、酸性食品は4%酢酸、酒類は20%エタノール、油脂及び脂肪性食品は合成樹脂ではヘプタン、ゴムでは20%エタノールが用いられる。しかし、ヘプタンや20%エタノールは油脂及び脂肪性食品とは異なる溶出挙動をとることから、代替溶媒として適当であるか疑問がある。

油脂及び脂肪性食品の最適な食品擬似溶媒はオリーブ油などの植物油である。植物油は油脂及び脂肪性食品の一つであり、その中でも溶出力が高い。そのため、植物油は油脂及び脂肪性食品用器具・容器包装への特定物質の移行試験などで、溶出溶媒としてしばしば使用される。しかし、蒸発乾固が困難であることから蒸発残留物試験に使用することはできない。

欧州連合では、油脂及び脂肪性食品用食品接触物質に対する溶出物の総量試験として、オリーブ油総溶出物量試験 (Overall migration test into olive oil) を規定している。また、その試験法は欧州標準規格に EN 1186-2 Test methods for overall migration into olive oil by total immersion (EN法)¹⁾として記載されている。この試験法は、オリーブ油への溶出による試料質量の変化と試料に残存するオリーブ油量から溶出量を求める。しかし、操作が極めて煩雑で長時間を要し、試験誤差を生じる要因が多くしかも有害試

薬を使用するなど問題が多い。そのため、我が国で実施できる試験機関は限定される。

そこで、EN法をより精度が高く安全で、しかも簡便な試験法に改良することを目的として、平成25~26年度の本研究において、EN法をもとに、試料質量の測定、溶出後試料に残存する植物油の抽出及び定量などの改良を検討した。その結果、有害試薬を使用せず、操作が簡便で試験時間が短い改良試験法(改良法)を確立した。さらに、改良法とEN法を用いて各種試料の植物油総溶出物量試験を行い、改良法により得られる試験結果はEN法と同等であることを確認した。

今年度は、確立した改良法を用いて10機関による試験室間共同試験を実施し、改良法の性能評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 参加機関

試験室間共同試験には以下の10機関が参加した。

東京都健康安全研究センター

埼玉県衛生研究所

国立医薬品食品衛生研究所

(公社)日本食品衛生協会

(一財)化学研究評価機構・東京事業所

(一財)化学研究評価機構・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)東京顕微鏡院

2. 検体

天然ゴム：天然ゴム製シート(23 cm×15 cm、厚さ 0.5 mm)

ポリエチレン：ジッパー付ポリエチレン製袋(28 cm×27 cm、厚さ 0.068 mm)

ポリプロピレン：ポリプロピレン製シート(35 cm×24 cm、厚さ 0.5 mm)

検体の厚さは製品に表示された値を示した。各検体は国立医薬品食品衛生研究所で購入し、平成 27 年 6 月 5 日に各参加機関に配布した。

検体は、各機関において天然ゴムは 3 × 3 cm、ポリエチレンとポリプロピレンは 10 × 10 cm に切断し試験用試料とした。

3. 試験

試験は「<別添>市販製品に残存する化学物質に関する研究 - 植物油総溶出物量試験改良法の性能評価 - 平成 27 年度 試験室間共同試験計画書」に従って行った。

参加機関は、各検体(表面積 $S \text{ cm}^2$) 3 試行の溶出前試料質量(W_a)、溶出後試料質量(W_b)、溶出後試料中の残存植物油量(W_c)、溶出前後の試料質量差($W_b - W_a$)、溶出物量($W_a - W_b + W_c$)及び試料表面積当たりの植物油総溶出物量($(W_a - W_b + W_c)/S$)を報告した。

4. 定量値の解析

各試験機関から収集した定量値について、ISO 5725-2²⁾ 及び JIS Z 8402-2³⁾ に基づいて解析を行った。最初に Cochran 検定及び Grubbs 検定を行い、併行再現性と試験室間再現性の検定を行った。ここで危険率 1% 未満のものを精度の外れ値とした。性能パラメーターである併行精度 (RSD_r) 及び室間精度 (RSD_R) の値は、一元配置の分散分析により求めた。

今回の検体はいずれも植物油総溶出物

量の真値が不明であることから真度は算出しなかった。ただし、共同試験で得られた定量値の中央値を参照真値とし、同一機関の平均値が参照真値の 70~120% の範囲から外れたものを真度の外れ値とした。

また、国際的な分析法である Official Methods of AOAC INTERNATIONAL では、共同試験による試験法の評価において、精度の外れ値は棄却して性能パラメーターを算出することを推奨している⁴⁾。精度の外れ値はその機関固有の問題に由来すると判断するためである。そこで、精度の外れ値が存在する場合には、AOAC 法に従いそれらを棄却した性能パラメーターの算出も行った。

各性能パラメーターの目標値は「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(農薬等ガイドライン)⁵⁾を参考に併行精度 (RSD_r) 10% 以下及び室間精度 (RSD_R) 25% 以下とした。

改良法の基となった EN 法の 2 回の共同試験で得られた性能パラメーターは、EN 1186-2 Test methods for overall migration into olive oil by total immersion¹⁾ の Annex F に記載されている。そこで、下記に示したそれらのデータも参照した。なお、いずれの共同試験もプラスチックフィルムの材質については記載がなかった。

1 回目：11 機関、総溶出物量平均値 6.6 mg/dm²、併行精度 $r = 2.0 \text{ mg/dm}^2$ ($RSD_r = 30\%$)、室間精度 $R = 2.9 \text{ mg/dm}^2$ ($RSD_R = 44\%$)

2 回目：8 機関、総溶出物量平均値 8.3 mg/dm²、併行精度 $r = 1.8 \text{ mg/dm}^2$ ($RSD_r = 22\%$)、室間精度 $R = 3.7 \text{ mg/dm}^2$ ($RSD_R = 45\%$)

また、植物油総溶出量以外の定量値についても精度や真度の検定及び性能パラメー

ターを算出し、各工程の検証を行った。溶出後試料質量、残存植物油量、試料質量差は試料中の残存植物油の除去の程度により変化する数値であり真値は存在しないが、他機関との比較の参考のため真度の外れ値を示した。

C. 研究結果及び考察

1. 検体と溶出試験条件の選択

1) 検体

平成 25～26 年度の試験法の改良において使用した 6 種類の材質のうち、汎用合成樹脂であるポリエチレンとポリプロピレン、汎用ゴムである天然ゴムを試験室間共同試験の検体として使用した。

ポリプロピレンは昨年度使用した厚さ 0.03 mm のフィルムでは植物油総溶出物量が $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満であったことから、厚さが 15 倍以上の 0.5 mm のシートに変更した。また、ポリエチレンも昨年度とは異なるポリエチレン袋を使用した。天然ゴムは昨年度と同じシートを使用した。

2) 植物油への溶出条件

本試験法では、所定の条件で植物油への溶出試験が行われた検体について、植物油総溶出物量を定量することを目的とする。そのため、検体中の物質を植物油中に移行させる溶出試験の工程は、本試験法の範囲外である。しかし、溶出試験の条件は植物油総溶出物量にも大きな影響を与える。溶出試験温度が低いと植物油総溶出物量は低くなり、60 付近では多くの合成樹脂で定量限界未満となる。一方、溶出試験温度を高くすると総溶出物量は高くなるが、設定された試験温度にばらつきが生じやすくなり、その結果総溶出物量もばらつくことになる。そこで、溶出物量が多い天然ゴムで

は試験条件を 40～30 分間、高温でないと溶出物を生じにくいポリエチレンとポリプロピレンは 80～30 分間に設定した。

2. 試験室間共同試験の結果

1) 天然ゴムにおける解析

共同試験の定量値

天然ゴムにおける全 10 機関 3 試行の植物油総溶出物量 $((W_a - W_b + W_c)/S)$ と溶出前試料質量 (W_a) 、溶出後試料質量 (W_b) 、溶出後試料中の残存植物油量 (W_c) 、溶出前後の試料質量差 $(W_b - W_a)$ 及び溶出物量 $(W_a - W_b + W_c)$ を表 1 に示した。また、それらの中央値、平均値、併行精度 (RSD_f) 、室間精度 (RSD_R) 、精度及び真度の外れ値を併記した。

植物油総溶出物量の解析

植物油総溶出物量の定量値は 542～783 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲にあり、中央値は 647 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、平均値は 657 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

Cochran 検定では、試験機関 h が危険率 5% 以下で併行精度の異常値と判定されたが、外れ値にはあたらなかった。さらに、Grubbs 検定では異常値、外れ値はなく、室間精度には問題はみられなかった。

また、試験機関 a、d、f が中央値の 110% を超えていたが、120% を超えるものや 70% 未満のものはなく、真度の外れ値もなかった。

併行精度は 2.6%、室間精度は 14.8% であり、目標値である 10% 及び 25% を十分に満たしていた。改良前の EN 法の性能パラメーターである併行精度 30 及び 22%、室間精度 44 及び 45% と比較すると、併行精度が約 1/10、室間精度が約 1/3 となり、改良法の性能が大きく向上していることが確認された。

表1 試験室間共同試験における天然ゴムの植物油総溶出物量及び各工程の定量値

試験機関	植物油総溶出物量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	溶出前試料質量 W_a (mg)	溶出後試料質量 W_b (mg)	残存植物油量 W_c (mg)	試料質量差 $W_b - W_a$ (mg)	溶出物量 $W_a - W_b + W_c$ (mg)
a	758, 769, 783	676.3, 675.7, 671.6	692.2, 691.4, 687.6	29.6, 29.6, 30.1	15.9, 15.7, 16.0	13.7, 13.9, 14.1
b	618, 616, 649	656.5, 639.3, 666.4	670.9, 652.6, 681.4	25.5, 24.4, 26.7	14.3, 13.3, 15.0	11.1, 11.1, 11.7
c	710, 720, 700	678.3, 683.0, 677.7	694.1, 701.1, 695.0	28.6, 31.1, 30.0	15.8, 18.1, 17.3	12.8, 13.0, 12.7
d	739, 739, 733	674.7, 684.7, 668.9	692.6, 701.9, 685.8	31.2, 30.5, 30.1	17.9, 17.2, 16.9	13.3, 13.3, 13.2
e	574, 578, 566	643.5, 644.2, 646.3	655.2, 656.9, 658.4	22.1, 23.1, 22.4	11.7, 12.7, 12.2	10.3, 10.4, 10.2
f	739, 767, 744	692.2, 707.6, 710.0	710.2, 725.7, 729.0	31.4, 31.9, 32.4	18.0, 18.1, 19.0	13.3, 13.8, 13.4
g	542, 553, 550	658.7, 658.6, 660.7	674.9, 674.3, 677.3	26.0, 25.7, 26.5	16.2, 15.7, 16.6	9.8, 10.0, 9.9
h	654, 582, 606	716.4, 660.8, 690.5*	733.8, 678.3, 710.8*	29.2, 28.0, 31.2	17.4, 17.5, 20.3	11.8, 10.5, 10.9
i	580, 592, 622	675.1, 670.6, 694.6	689.5, 685.6, 709.1	24.8, 25.7, 25.7	14.4, 15.0, 14.5	10.4, 10.7, 11.2
j	645, 656, 627	676.2, 672.9, 673.3	691.2, 688.1, 688.3	26.6, 27.1, 26.3	15.0, 15.3, 15.0	11.6, 11.8, 11.3
中央値	647	674.0	688.9	27.5	15.9	11.6
平均値	657	673.5	689.4	27.8	15.9	11.8
併行精度 (RSD _F (%))	2.6	1.7	1.7	3.0	4.9	2.6
室間精度 (RSD _R (%))	14.8	3.3	3.5	13.2	15.4	14.9

*: Cochran 検定で精度の外れ値と判定 (危険率 < 1%)

本試験法は試験工程が複雑で、しかも参加機関のうち1機関を除いて初めての試験実施であったにもかかわらず、極めて良好な性能パラメーターが得られ、改良法の優れた試験性能が検証された。

各工程の検証

a) 溶出前及び溶出後試料質量

溶出前試料質量(W_a)及び溶出後試料質量(W_b)は、Cochran検定において試験機関hが両者とも危険率1%未満の外れ値で定量値の変動がやや大きいと判定された。両者が同様に変動しており、試料調製時のばらつきによると判断された。

b) 残存植物油量と試料質量差

残存植物油量(W_c)及び溶出前後の試料質量差($W_b - W_a$)では真度の外れ値はみられなかったが、定量値が中央値の70~80%または110~120%で異常値となったものが散見された。これらは溶出試験後の試料中のオリブ油除去の程度によるものであり、試験結果に影響しないはずである。しかし、残存植物油量(W_c)が比較的多かった機関では、植物油総溶出物量も中央値の110~120%と多い傾向が見られた。しかし、植物油総溶出物量の定量値において精度、真度ともに外れ値は存在せず、試験法の各工程に特に問題点はないと判断された。

2) ポリエチレンにおける解析

共同試験の定量値

ポリエチレンにおける全10機関3試行の植物油総溶出物量及び各工程の定量値を表2に示し、それらの中央値、平均値、併行精度、室間精度、真度及び精度の外れ値の検定結果を併記した。

植物油総溶出物量定量値の解析

a) 定量値の検定

各機関の植物油総溶出物量は19~73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲にあり、中央値は36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、平均値は38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

Cochran検定では、試験機関e及びfが併行精度の外れ値と判定された。一方、Grubbs検定では危険率5%未満の異常値も見られず、室間精度には問題がなかった。

次に、定量値の真度の検定を行ったところ、試験機関a及びiは中央値の70%未満、e及びfは120%超であり、これら4機関が真度の外れ値となった。

b) 性能パラメーターの解析

ポリエチレンにおける植物油総溶出物量試験の性能パラメーターを表3にまとめた。

まず全機関の総溶出物量定量値を用いて算出したところ、併行精度10.6%、室間精度37.6%であった。EN法の性能パラメーターである併行精度30及び22%、室間精度44及び45%と比較すると、併行精度の値は1/3~1/2まで小さくなり、室間精度も向上していることが示された。しかし、室間精度は目標値より大きかった。

一方、AOAC法に従い、併行精度で外れ値と判定された試験機関e及びfを棄却した8機関で性能パラメーターを求めたところ、併行精度だけでなく室間精度も向上し、それぞれ4.3%及び26.1%であった。目標値と比較すると、併行精度は十分満たし、室間精度も目標値に近似していた。なお、下記の各工程の検証において、これら2機関は残存植物油量測定時に問題があったと考えられることから、ポリエチレンにおける性能評価においてこれら2機関を棄却することは妥当と判断された。

表2 試験室間共同試験におけるポリエチレンの植物油総溶出物量及び各工程の定量値

試験機関	植物油総溶出物 量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	溶出前試料質量 W_a (mg)	溶出後試料質量 W_b (mg)	残存植物油量 W_c (mg)	試料質量差 $W_b - W_a$ (mg)	溶出物量 $W_a - W_b + W_c$ (mg)
a	<u>26, 26, 23</u>	585.3, 581.5, 574.3	592.2, 588.4, 581.5	12.0, 12.0, 11.9	6.9, 6.9, 7.2	<u>5.1, 5.1, 4.7</u>
b	40, 40, 36	616.4, 591.6, 619.7	624.9, 599.2, 627.8	16.6, 15.6, 15.3	8.5, 7.6, 8.1	8.1, 8.0, 7.2
c	36, 35, 38	731.0, 711.6, 739.4	743.6, 725.0, 754.5	<u>19.7, 20.4, 22.6</u>	<u>12.6, 13.4, 15.1</u>	7.1, 7.0, 7.5
d	35, 33, 35	742.0, 683.2, 677.4	749.9, 691.4, 684.7	14.9, 14.8, 14.2	7.9, 8.2, 7.3	7.0, 6.6, 6.9
e	<u>55, 49, 45*</u>	701.0, 696.6, 659.4	709.0, 704.6, 667.2	19.1, 17.7, 16.7	8.0, 8.0, 7.8	<u>11.1, 9.7, 8.9*</u>
f	<u>56, 73, 52*</u>	648.5, 660.6, 615.1	663.8, 674.4, 629.9	<u>27.0, 28.3, 25.1</u>	<u>15.3, 13.8, 14.8</u>	<u>11.7, 14.5, 10.3*</u>
g	42, 43, 40	728.6, 732.7, 720.0	738.5, 742.6, 731.1	18.4, 18.5, 19.0	<u>9.9, 9.9, 11.1</u>	8.5, 8.6, 7.9
h	38, 37, 36	623.7, 583.5, 584.6	632.1, 590.9, 592.7	15.9, 14.8, 15.4	8.4, 7.4, 8.1	7.5, 7.4, 7.3
i	<u>19, 22, 21</u>	585.5, 618.3, 599.7	593.1, 626.1, 607.0	11.5, 12.3, 11.5	7.6, 7.8, 7.3	<u>3.9, 4.5, 4.2</u>
j	36, 35, 35	762.6, 753.0, 719.3	775.1, 765.6, 731.3	19.7, 19.5, 18.9	<u>12.5, 12.6, 12.0</u>	7.1, 6.9, 6.9
中央値	36	660.0	670.8	16.6	8.2	7.3
平均値	38	661.5	671.3	17.3	9.7	7.6
併行精度 (RSD _r (%))	10.6	3.1	3.1	5.1	6.2	10.6
室間精度 (RSD _R (%))	37.6	11.8	11.9	32.0	35.9	37.5

_: [(各機関の定量値の平均値)/中央値 × 100 (%)]が 70%未満または 120%を超え真度の外れ値と判定

*: Cochran 検定で精度の外れ値と判定 (危険率 < 1%)

表3 ポリエチレンの植物油総溶出物量試験における性能パラメーター

性能パラメーター	全機関	AOAC 法*
有効データ数	10	8
中央値 (µg/cm ²)	36	35
平均値 (µg/cm ²)	38	34
併行精度 (RSD _i (%))	10.6	4.3
室間精度 (RSD _R (%))	37.6	26.1
外れ値 (真度) 数	4/10	1/8
外れ値 (精度) 数	2/10	0/8

*: AOAC 法に従い併行精度が外れ値であった 2 機関を棄却した

各工程の検証

ポリエチレンにおける植物油総溶出物量試験の性能はほぼ満足できる結果であったが、天然ゴムと比較すると定量値の変動が大きく、天然ゴムでは見られなかった外れ値も存在し、ポリエチレンの試験に何らかの問題があったことが推測された。そこで、それらを探るため、表 2 に示した各工程の定量値について検証を行った。

a) 溶出前及び溶出後試料質量

溶出前(W_a)及び溶出後試料質量(W_b)は、全ての定量値で真度及び精度の外れ値は見られず、質量測定工程では天然ゴムと同様に特段の問題はなかったと考えられた。

しかし、溶出前試料質量の室間精度は、天然ゴムの 3.3 % に対しポリエチレンでは 11.8% と約 3.5 倍であった。溶出前試料質量は、検体が均一でしかも正しい大きさに裁断されていれば同一の値に収斂するべきものであり、調製試料のばらつきが懸念された。

そこで、試験に使用したポリエチレン袋の厚さを測定したところ、ジッパー周辺が厚く、部位により厚さが 0.065 ~ 0.092 mm と不均一であることが確認された。また、ポリエチレンの検体は天然ゴムよりも薄くしかも試料サイズが 10 × 10 cm と大きいことから真っ直

ぐに切断しにくく、切断時の誤差を生じやすい。そのため、ポリエチレンの試料質量にばらつきが生じたものと推察された。

そこで、この溶出前試料質量のばらつきが植物油総溶出物量に影響を与えていないか両者の相関を調べたところ(図 1)、相関係数は 0.276 でほとんど相関は見られなかった。しかし、総溶出物量において併行精度が外れ値であった試験機関 e 及び f を除くと、相関係数は 0.514 に上昇し正の相関が見られた。すなわち、総溶出物量の併行精度が外れ値ではない 8 機関では、試料質量の変動が総溶出物量の変動の一因であることが示唆された。

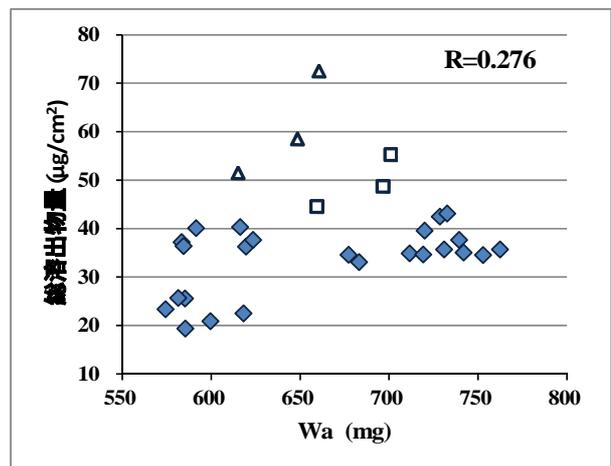


図1 溶出前試料質量と植物油総溶出物量の相関

: 機関 e , : 機関 f , : その他

b) 残存植物油量及び試料質量差

表 2 に示すように、試料中の残存植物油量(W_c) は 2 機関が 120% 超の外れ値であり、室間精度 32.0% と変動が大きかった。また、溶出前後の試料質量差($W_b - W_a$)も 4 機関が 120% 超、室間精度が 35.9% と同程度にばらつきが大きかった。

両者の値は溶出試験後除去しきれなかった植物油の量に依存することから、植物油除去の程度に応じて変動し、1 つの値に収斂するわけではない。また、残存した植物油の量は溶出物量算出時に相殺されることから、総溶出物量に影響を与えないはずである。しかし、植物油総溶出物量で真度の外れ値または異常値となった 5 機関のうち 4 機関は、残存植物油量でも真度の外れ値または異常値となっており、両者の関連が疑われた。

そこで、残存植物油量と植物油総溶出物量の相関を調べたところ、全機関では相関係数 0.838 と正の強い相関がみられた(図 2)。しかし、植物油総溶出物量で真度の外れ値となった 4 機関を除く 6 機関では、植物油総溶出物量は 33 ~ 43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲に

収束し、両者に相関は見られなかった(相関係数 0.118)。一方、外れ値の 4 機関のみでは相関係数 0.942 という高い相関が見られた。すなわち、外れ値となった 4 機関では、本来相関しないはずの植物油総溶出物量と残存植物油量の測定値が強く相関していた。このことから、これら 4 機関の総溶出物量が真度の外れ値となった原因として、残存植物油の測定値が何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

そこで、残存植物油量と溶出前後の試料質量差の関係についても調べた(図 3)。

両者はその定義から下記のような関係が成り立つ。

$$\text{溶出物量}(W_a - W_b - W_c) = - \text{溶出前後の試料質量差}(W_b - W_a) + \text{残存植物油量}(W_c)$$

溶出物量は一定値となるべき数値(推定真値 7.3 mg)であることから、理論的には残存植物油量と試料質量差は $y = x - 7.3$ の直線関係となる。図 3 に示すように、植物油総溶出物量が外れ値ではない 6 機関の定量値はほぼこの直線上に位置した。

しかし、植物油総溶出物量が 120% 超で外れ値となった試験機関 e 及び f は、直線

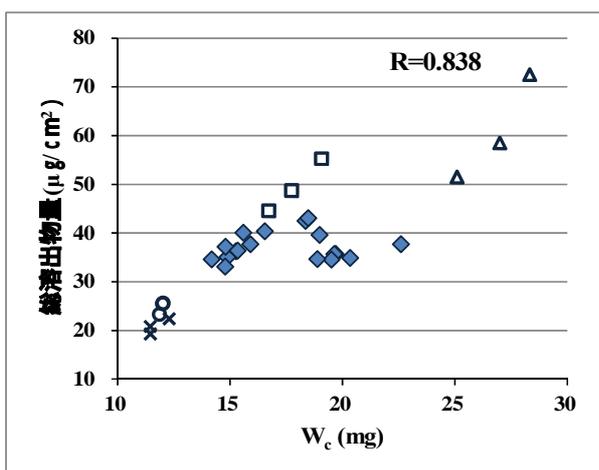


図 2 残存植物油量と植物油総溶出物量の相関
○ : 機関 a , □ : 機関 e , △ : 機関 f , × : 機関 i , ● : その他

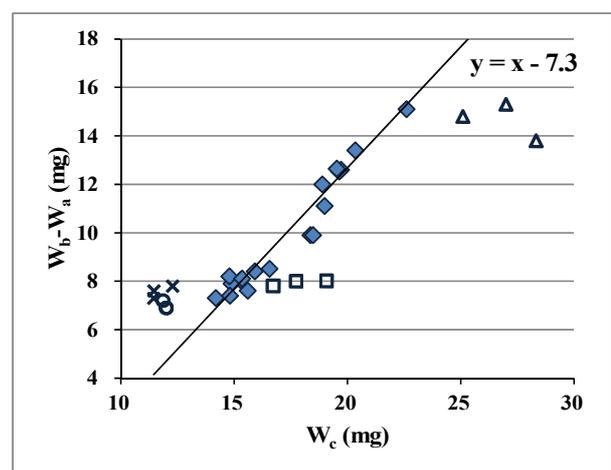


図 3 残存植物油量と試料質量差の関係
○ : 機関 a , □ : 機関 e , △ : 機関 f , × : 機関 i , ● : その他

の右側に3点が横に広がるように存在した。すなわち残存植物油量が試料質量差に比して大きく、しかも3試行のばらつきが大きい。このことから、これら2機関では残存植物油の定量操作、たとえばGC測定時のGCの安定性、妨害ピークなどの問題により正方向にばらつきを生じたと推察された。

一方、植物油総溶出物量が70%未満で外れ値となった試験機関a及びiは直線の左側にまとまって位置し、残存植物油量が試料質量差に比して小さいものの、それら6試験値はほぼ一致していることが示された。残存植物油の定量操作、たとえばGC測定時の検量線の問題により負方向に変動した、または溶出時の試験温度がやや低く溶出量が減少したなどの可能性が推測された。

ポリエチレンにおける性能評価

このようにポリエチレンの共同試験の結果は、全機関の定量値を用いて算出すると併行精度はほぼよかったが室間精度は大きかった。それでも、EN法と比較すると併行精度、室間精度とも改善が確認された。また、AOAC法に従い精度が外れ値の機関を棄却すると、併行精度は目標値を十分満たし、室間精度はわずかに超過しているものの満足できる性能があると判断された。

天然ゴムより性能パラメーターの変動が大きくなった原因として、残存植物油量の測定時のばらつきと試料調製時の試料のばらつきが示唆された。しかし、試料のばらつきは本試験法の操作外の要因であり、一定サイズに切断した均一の試料を配布していれば、併行精度や室間精度はさらに良好だったと推察され、今回の共同試験において反省すべき点であった。

3) ポリプロピレンにおける解析

共同試験の定量値

ポリプロピレンにおける全10機関3試行の植物油総溶出物量及び各工程の定量値を表4に示した。また、それらの中央値、平均値、併行精度、室間精度及び外れ値の検定結果を併記した。

植物油総溶出物量定量値の解析

a) 定量値の検定

表4に示すように各機関の植物油総溶出物量は $-9.6 \sim 8.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲にあり、試験機関a及びiは全てマイナスであった。

定量値の併行精度の検定のためCochran検定を行ったところ、試験機関iが危険率1%未満で外れ値と判定された。一方、Grubbs検定では異常値は見られず、室間精度については特に問題はなかった。

次に、定量値の真度の検定を行ったところ、試験機関a、d及びiは70%未満、b、c、h及びjは120%超であったことから、7機関が外れ値となった。

b) 性能パラメーターの解析

ポリプロピレンの植物油総溶出物量の定量値についていくつかの方法で算出した性能パラメーターを表5に示した。

全機関の定量値を用いて性能パラメーターを求めると、併行精度37.8%、室間精度165.7%で変動が極めて大きかった。改良前のEN法の性能パラメーター(併行精度30及び22%、室間精度44及び45%)と比較しても良好とは言えなかった。

次に、AOAC法に従い併行精度で外れ値と判定された試験機関iを棄却した9機関の定量値について性能パラメーターを求めたところ、併行精度19.2%、室間精度87.8%とかなり改善されたが、いずれも目標値より大きかった。

表4 試験室間共同試験におけるポリプロピレンの植物油総溶出物量及び各工程の定量値

試験機関	植物油総溶出物量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	溶出前試料質量 W_a (mg)	溶出後試料質量 W_b (mg)	残存植物油量 W_c (mg)	試料質量差 $W_b - W_a$ (mg)	溶出物量 $W_a - W_b + W_c$ (mg)
a	<u>-1.5, -1.3, -1.4</u>	4570.2, 4592.4, 4598.7	4582.3, 4604.7, 4610.5	11.8, 12.1, 11.5	12.1, 12.3, 11.8	<u>-0.3, -0.3, -0.3</u>
b	<u>7.0, 7.4, 6.7</u>	4453.6, 4495.7, 4373.8	4461.4, 4503.8, 4384.1	9.2, 9.6, 11.6	7.9, 8.1, 10.3	<u>1.4, 1.5, 1.3</u>
c	<u>7.4, 7.0, 8.0</u>	4464.6, 4544.8, 4512.3	4476.7, 4556.9, 4524.9	13.6, 13.5, 14.2	12.1, 12.1, 12.6	<u>1.5, 1.4, 1.6</u>
d	<u>-0.5, -1.0, 0.5</u>	4485.2, 4477.1, 4503.3	4496.7, 4489.6, 4516.0	11.4, 12.3, 12.8	11.5, 12.5, 12.7	<u>-0.1, -0.2, 0.1</u>
e	6.2, 5.3, 4.8	4477.8, 4490.2, 4497.8	4491.7, 4506.0, 4516.7	<u>15.1, 16.9, 19.9*</u>	<u>13.9, 15.8, 18.9*</u>	1.2, 1.1, 1.0
f	5.0, 5.5, 3.0	4602.4, 4625.1, 4639.5	4614.2, 4637.8, 4651.8	12.8, 13.8, 12.9	11.8, 12.7, 12.3	1.0, 1.1, 0.6
g	5.1, 6.0, 4.3	4489.9, 4529.9, 4488.7	4501.2, 4541.0, 4499.5	12.3, 12.3, 11.7	11.3, 11.1, 10.8	1.0, 1.2, 0.9
h	<u>6.1, 8.1, 8.1</u>	4478.8, 4510.4, 4490.8	4491.0, 4522.9, 4501.0	13.4, 14.1, 11.8	12.2, 12.5, 10.2	<u>1.2, 1.6, 1.6</u>
i	<u>-7.0, -3.1, -9.6*</u>	4473.1, 4439.6, 4466.2	4480.9, 4446.6, 4474.0	<u>6.4, 6.4, 5.9</u>	<u>7.8, 7.0, 7.8</u>	<u>-1.4, -0.6, -1.9*</u>
j	<u>6.3, 5.5, 8.2</u>	4456.4, 4488.1, 4444.0	4467.6, 4498.6, 4455.0	12.4, 11.6, 12.6	11.1, 10.5, 10.9	<u>1.3, 1.1, 1.6</u>
中央値	5.4	4490.1	4501.1	12.3	11.8	1.1
平均値	3.5	4505.3	4516.8	12.2	11.5	0.7
併行精度 (RSD _r (%))	37.8	0.6	0.6	8.3	9.1	37.8
室間精度 (RSD _R (%))	165.7	1.6	1.6	28.6	25.5	164.9

_: [(各機関の定量値の平均値)/中央値 × 100 (%)]が 70%未満または 120%を超え真度の外れ値と判定

*: Cochran 検定で精度の外れ値と判定 (危険率 < 1%)

表5 ポリプロピレンの植物油総溶出物量試験における性能パラメーター

試験機関	全機関	AOAC 法	定量限界を設定
a	<u>-1.5, -1.3, -1.4</u>	<u>-1.5, -1.3, -1.4</u>	ND, ND, ND
b	<u>7.0, 7.4, 6.7</u>	<u>7.0, 7.4, 6.7</u>	7.0, 7.4, 6.7
c	<u>7.4, 7.0, 8.0</u>	<u>7.4, 7.0, 8.0</u>	7.4, 7.0, 8.0
d	<u>-0.5, -1.0, 0.5</u>	<u>-0.5, -1.0, 0.5</u>	ND, ND, ND
e	6.2, 5.3, 4.8	6.2, 5.3, 4.8	6.2, 5.3, ND
f	5.0, 5.5, 3.0	5.0, 5.5, 3.0	5.0, 5.5, ND
g	5.1, 6.0, 4.3	5.1, 6.0, 4.3	5.1, 6.0, ND
h	<u>6.1, 8.1, 8.1</u>	<u>6.1, 8.1, 8.1</u>	6.1, 8.1, 8.1
i	<u>-7.0, -3.1, -9.6*</u>	-	ND, ND, ND
j	<u>6.3, 5.5, 8.2</u>	<u>6.3, 5.5, 8.2</u>	6.3, 5.5, 8.2
有効データ数	10	9	7
中央値	5.4	5.5	6.2
平均値	3.5	4.7	6.2
併行精度 (RSD _r (%))	37.8	19.2	15.6
室間精度 (RSD _R (%))	165.7	87.8	26.0
外れ値 (真度) 数	7/10	6/9	0/7
外れ値 (精度) 数	1/10	0/9	0/7

植物油総溶出物量の単位: $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、AOAC 法: 併行精度が外れ値であった機関を棄却

定量限界を設定: 定量限界を $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満とし、定量値がすべて定量限界以下の機関を棄却

_: [(各機関の定量値の平均値)/中央値 $\times 100$ (%)] が 70% 未満または 120% を超え真度の外れ値と判定

*: Cochran 検定で精度の外れ値と判定 (危険率 < 1%)

このように定量値がばらつくのは、得られた植物油総溶出物量の定量値が平均で3.5及び4.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ と低いためと考えられた。平成26年度の研究報告書⁶⁾では、本法の定量限界を試料の表面積200 cm^2 の場合に5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ と設定した。すなわち、試料質量測定時に質量の変動が ± 0.5 mg以下になるまで繰り返し測定を行うことから、質量の許容誤差は0.5 mg以下である。溶出前後の質量差は0.5 mgの誤差を2回含むことから1 mgの誤差を許容している。一方、残存植物油の定量限界は0.05 mgと十分に低い。このことから、溶出物量 ($W_a - W_b + W_c$)

が1 mg以下となった場合はその値を信頼できない。すなわち ($W_a - W_b + W_c$) の定量限界は1 mgとなり、これを表面積で除した総溶出物量は、試料表面積200 cm^2 の場合に定量限界5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となる。

しかし、今回の共同試験では試験結果の比較検討のため定量限界は設定せず、得られた定量値をそのまま報告してもらった。その結果、ポリプロピレン共同試験で得られた定量値30個のうち12個が5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満となった。

そこで、これらを定量限界未満とし、定量値が3個とも定量限界未満の場合は性能パラ

メーター算出に使用できないことから棄却し、1個のみ定量限界未満の場合は実測値を用いて性能パラメーターを計算した。その結果、併行精度が15.6%、室間精度が26.0%となり、目標値よりわずかに大きいものの定量限界近傍ということを経験すれば十分満足できる性能パラメーターが得られた。

また、このように5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 近傍まで精度良く定量できたことから、本法の定量限界として試料表面積200 cm^2 の場合には5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ が妥当であることが確認された。

各工程の定量値の検証

ポリプロピレンの植物油総溶出物量の試験結果は、定量限界近傍のため、併行精度、室間精度がやや大きかった。そこで、表4に示した各工程の定量値についても検証を行った。

a) 溶出前及び溶出後試料質量

溶出前(W_a)及び溶出後試料質量(W_b)は、全ての定量値で真度及び精度の外れ値は見られず、併行精度、室間精度ともに天然ゴムやポリエチレンよりも良好であった。検体が厚手のシートであり、シート自体が均一でしかも切断しやすく、試料調製時のばらつきが生じにくかったと考えられる。このように、質量測定工程では特に問題は見られなかった。

b) 残存植物油量及び試料質量差

試料中の残存植物油量(W_c)は1機関が併行精度の外れ値、真度は1機関が120%超で1機関が70%未満の外れ値であった。併行精度8.3%、室間精度28.6%であり、ポリエチレンの残存植物油量の変動とほぼ同程度であった。また、溶出前後の試料質量差($W_b - W_a$)は真度の外れ値2機関、精度の外れ値1機関でいずれも残存植物油量と同じ機関であった。また、併行精度が9.1%、

室間精度が25.5%であり、これも残存植物油量と同程度であった。このことから、溶出前後の試料質量差及び残存植物油量で見られた定量値の変動は、溶出後の残存植物油除去の程度によるものであり、両方で相殺されることから、試験法の精度には関わらないと判断された。

ポリプロピレンにおける性能評価

以上のように、ポリプロピレンの各工程では極めて良好な定量値が得られており、総溶出物量の変動は定量値が低いために試料質量測定時の許容誤差が影響したものであることが明かとなった。定量限界を5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ に設定することにより、併行精度15.6%、室間精度26.0%となり、目標値よりやや大きいものの、定量限界近傍ということを経験すれば十分満足できる試験性能であると評価された。

4) 改良法の総合的な性能評価

今回の共同試験で得られた性能評価結果を表6にまとめた。

天然ゴムで得られた本試験法の性能パラメーターは、併行精度2.6%、室間精度14.8%、真度及び精度の外れ値なしという極めて良好な結果であり、目標値も十分に満たしていた。天然ゴムでは共同試験実施で特段の問題も生じておらず、この結果は本試験法の優れた性能を示すものといえる。

ポリエチレンでは、全機関の併行精度10.6%、室間精度37.6%は目標値には届かなかったが、改良前のEN法の性能評価データよりはるかに優れていた。さらに、AOAC法に従い、併行精度で外れ値であった2機関を棄却すると、併行精度4.3%及び室間精度26.1%であり、ほぼ満足できる試験性能であることが示された。

表6 植物油総溶出物量試験改良法の性能評価結果

材質	天然ゴム	ポリエチレン		ポリプロピレン	
		全機関	AOAC 法	全機関	定量限界
有効データ数	10	10	8	10	7
中央値 (µg/cm ²)	647	36	35	5.4	6.2
平均値 (µg/cm ²)	657	38	34	3.5	6.2
併行精度 (%)	2.6	10.6	4.3	37.8	15.6
室間精度 (%)	14.8	37.6	26.1	165.7	26.0
外れ値 (真度)	0/10	4/10	1/8	7/10	0/7
外れ値 (精度)	0/10	2/10	0/8	1/10	0/7

一方、ポリプロピレンでは、全機関の定量値を用いると、併行精度 37.8%、室間精度 165.7%という極めて高い数値となった。これはすべての定量値が昨年度設定していた定量限界 5 µg/cm² 付近で極めて低いことが原因と考えられた。そこで、定量限界 5 µg/cm² を設定し、定量値がすべて定量限界未満の試験機関の結果を棄却してパラメーターを算出したところ、併行精度 15.6%、室間精度 26.0%となり、定量限界近傍であることを考慮すれば十分満足できる試験性能であった。

以上の結果から、本研究で確立した改良法は、改良前の EN 法よりもはるかに優れた試験性能を持ち、試験法として十分な性能を持つことが確認された。本改良法は、残存植物油の抽出時に内標準と共存させることにより抽出効率の補正が可能となり、また全体の試験工程が大幅に簡素化されたことなどにより、試験法の精度が著しく向上したものとする。

D. 結論

油脂及び脂肪性食品に接触して使用される器具・容器包装の総量試験法である EN 1186-2 Test methods for overall migration into

olive oil by total immersion (EN 法) について、平成 25 及び 26 年度で試験法の改良を行い、有害試薬を用いず、試験操作が簡便で、しかも試験時間が大幅に短縮できる改良法を確立した。

今年度は、改良法の性能を評価するため、天然ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレンの3種類の検体を用い、10 機関が参加した共同試験を実施した。その結果、本試験法はいずれの材質においても優れた試験性能をもつことが確認された。また、本試験法の定量限界は 5 µg/cm² が妥当と判断された。

今回の共同試験は、試験内容が通常の器具・容器包装の試験とは大きく異なり、しかも大部分の参加機関が初めて試験を実施した。それにもかかわらず良好な性能評価結果が得られ、本改良法は植物油総溶出物試験の試験法として優れた方法であることが結論された。

E. 参考文献

- 1) EN 1186-2:2002 Materials and articles in contact with foodstuffs-Plastics Part 2: Test methods for overall migration into olive oil by total immersion (2002)
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) Latimer G. ed., Official methods of analysis of AOAC International, 19th edition, Appendix D: Guidelines for collaborative

study procedures to validate characteristics of a method of analysis, AOAC International (2012)

- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第 1115001 号、食品中に残留する農薬等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 19 年 11 月 15 日）(2007)
- 6) 平成 26 年度厚生労働科学研究 食品用器具・容器包装等に含有される化学物質の分析に関する研究 総括・分担研究報告書, p.77 (2014)