

**(別添)**

**平成 27 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**

**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**

**平成 27 年 6 月 1 日**

## A 目的

オリーブ油などの植物油は、油脂及び脂肪性食品の一つであり、しかも溶出力が高いことから、油脂及び脂肪性食品における最適の食品擬似溶媒である。そのため、特定物質の移行量試験などで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、蒸発残留物量から総溶出物量を求める蒸発残留物試験に使用することはできない。そこで、欧州連合では、オリーブ油への総溶出物量を試料質量の変化から求めるオリーブ油総溶出物量試験 (Overall Migration Test into Olive Oil) を、油脂及び脂肪性食品用食品接触物質の総溶出物量試験として採用している。その試験法は欧州標準規格 EN 1186 (EN 規格) に収載されている。しかし、この試験法は操作が極めて煩雑で、各工程において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。そのため、試験には熟練した技術が求められ、我が国で実施できる試験機関は限られている。

平成 25～26 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」において本試験法の改良を検討した。その結果、オリーブ油だけでなくその他植物油にも適用可能で、より精度が高く、安全で、しかも簡便な植物油総溶出物量試験改良法を確立した。

そこで、今回、確立した植物油総溶出物量試験改良法について、ポリエチレン、ポリプロピレン、天然ゴムの 3 種類の検体を用いて試験室間共同試験を行い、試験法の性能評価を行うこととした。

## B 研究責任者及び解析者

責任者：国立医薬品食品衛生研究所 河村 葉子

解析者：(一財)日本食品分析センター 中西 徹

研究責任者及び解析者は、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。

## C スケジュール

実験計画の立案と調整・・・・・・・・・・・・・・・・研究責任者・解析者 各試験機関  
(4月～5月中旬)

検体の配付・・・・・・・・・・・・・・・・研究責任者 各試験機関  
(6月上旬に配付)

各試験機関で試験・・・・・・・・・・・・・・・・9月半ばまで3ヶ月半

結果の報告・・・・・・・・・・・・・・・・各試験機関 研究責任者 解析者  
(9月24日必着)

全体の結果を集約及び報告・・・・・・・・研究責任者 解析者による解析(10月)

報告書の作成・・・・・・・・・・・・・・・・研究責任者・解析者(11月～)

## D 試験の実施に関する要件

試験は必ず「I 試験手順」に従って行い、もし疑問点等があれば研究責任者まで確認すること。なお、試験に関する測定データ等は平成 29 年 3 月末日まで保存すること。

## E 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

国立医薬品食品衛生研究所

(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

(公社) 日本食品衛生協会

(一財) 東京顕微鏡院

合計 10 機関、機関コードは試料配布時に送付する。

## F 検体の配付

### 検体配付時期

検体の配付は 6 月上旬に研究責任者が行う。発送日は決まり次第参加機関に連絡する。各参加機関は必要な試薬の購入等の準備を適宜行うこと。

### 配付する検体

ポリエチレン袋 (厚さ 0.068 mm) 2 枚

ポリプロピレンシート (厚さ 0.5 mm) 1 または 2 枚

天然ゴムシート (厚さ 0.5 mm) 1 枚

#### 【注意】

- ・各検体とも 5 試料以上作成できるサイズである。
- ・1 試料のサイズは、ポリエチレン、ポリプロピレンは 10×10cm、天然ゴムは 3×3cm。

### 検体の確認

検体受領後はただちに内容を確認し、問題があれば速やかに研究責任者まで連絡すること。

### 検体の保管及び管理

検体は室温で保管すること。特別な注意は不要。

### 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、速やかに研究責任者に連絡すること。

## I 試験手順

### 試薬及び試液<sup>\*1</sup>

95%硫酸<sup>\*2</sup>：試薬特級以上

43%硫酸：水 547 g に 95%硫酸 453 g を少量ずつ混和する。

シクロヘキサン、ヘプタン<sup>\*3</sup>、酢酸：試薬特級以上

メタノール：残留農薬・PCB 試験用（5000 倍濃縮）または同等以上

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、  
和光純薬工業株式会社製<sup>\*4</sup>

オリブ油：和光純薬工業株式会社製

トリヘプタデカノイン：純度 99%以上、Sigma-Aldrich 社製<sup>\*5</sup>

内標準溶液：トリヘプタデカノイン 200 mg にシクロヘキサンを加えて溶解し、  
100 ml とする（2 mg/ml）。

### 【注意】

\*1 試液の調製においてスケールは適宜変更してよい。

\*2 95%以外の硫酸の場合には、43%硫酸調製時の硫酸と水の採取量を下式に従い変更  
すること。

$$\text{硫酸量 (g)} = 430 / \text{硫酸純度 (\%)} / 100、\text{水量 (g)} = 1000 - \text{硫酸量 (g)}$$

\*3 GC において妨害ピークを生じないこと。

\*4 500 ml: 2000 円、25 ml: 1300 円程度

\*5 別名：トリヘプタデカン酸グリセリル

入手に時間がかかる場合があるので早めに注文すること。

1 g: 45000 円程度

### 器具及び装置

硫酸デシケーター：43%硫酸を入れ 20±1 で平衡状態にしたデシケーター（相対  
湿度 50±2%）<sup>\*1</sup>

電子天秤：最小表示 0.1 または 0.01 mg

恒温水槽<sup>\*2</sup>

恒温振とう水槽<sup>\*3</sup>

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（GC-FID）又はガスクロマトグラフ-質  
量分析計（GC/MS）

### 【注意】

\*1 43%硫酸の適量をシャーレ等に入れ、デシケーターの目皿の下に置く（次ページ写  
真参照）。規定の温度で密閉すると相対湿度は 50%となる。安定した環境をつくる  
ことが目的であるため、デシケーターを恒温器内に置けないようであれば、温度を  
約 20～22 に設定した室内に放置してもよい。



- \*2 溶出操作の温度管理には恒温水槽を用いる。恒温振とう水槽を振とうさせずに用いてもよい。
- \*3 オリーブ油の抽出操作では 40 で振とうしながら用いる。メチルエステル化では水を入れずに振とうのみを行う。ここでは振とう器を用いてもよい。

### 試料の調製

ポリエチレン：ポリエチレン袋の印刷のない部分を 10 cm × 10 cm に切断

ポリプロピレン：ポリプロピレンシートを 10 cm × 10 cm に切断

天然ゴム：天然ゴムシートを 3 cm × 3 cm に切断

#### 【注意】

検体からできるだけ多くの試験片を作成し、それぞれの質量を測定し、ほぼ同等のものを試料として使用する。検体毎に 3 試行の結果を報告する。

### 予試験

溶出試験を行っていない未使用の試料<sup>\*1</sup> についてあらかじめ以下の ~ の操作を行い、ガスクロマトグラム上にオリーブ油由来のオレイン酸メチル及び内標準由来のヘプタデカン酸メチルの位置に定量を妨げるピークが存在しないことを確認する<sup>\*2</sup>。ただし、の操作では内標準溶液は加えず、シクロヘキサンを 200 ml 用いる。

同時に、オリーブ油 0.05 mg (オリーブ油 50 mg をヘプタンで 50 ml に定容したものを 50 µl 採取) についても、内標準溶液 10 ml を加え濃縮乾固後 ~ の操作を行う<sup>\*3</sup>。

#### 【注意】

- \*1 予試験では、作成した試験片のうち質量にばらつきがあったものや試料を採取した残り (5 × 10 cm を 2 枚など) を使用してもよい。試料とある程度近い質量が望ましいが厳密でなくてもよい。
- \*2 今回の試料では、オレイン酸メチルの位置にピークが認められるものもあるが、オリーブ油 0.05 mg のピークと同程度以下であれば定量に問題はない。オリーブ油吸収量の多い試料では定量限界の 2 倍程度でも問題はない。今回の検体では、それより大きいピークが検出される場合には機器の汚染が疑われるので、クリーニングしてから再度測定する

こと。

- \*3 オリーブ油 0.05 mg は本法の定量限界であり、ここまで定量可能であることを確認する。また、オレイン酸メチルやヘプタデカン酸メチルのピーク位置を確認し、試料中の妨害ピークの有無や大きさの判断に用いる。平成 26 年度報告書 p.81、p.87 のクロマトグラム参照。

### 溶出前の試料質量の測定

試料は質量を測定し<sup>\*1, \*2</sup>、硫酸デシケーター（43%硫酸で温度  $20 \pm 1$ 、湿度  $50 \pm 2\%$  で平衡化）に静置する<sup>\*3</sup>。約 24 時間以上間隔をあけて試料を取り出し<sup>\*4</sup>、質量を測定して前回測定した質量との質量差を求める。質量差が 0.5 mg 以下になるまでこの操作を繰り返す、最後に得られた質量を溶出前の試料質量（ $W_a$  mg）とする。

#### 【注意】

- \*1 質量は天秤に応じて表示されている 0.1 mg または 0.01 mg のケタまで測定し、その数字をそのまま記載する（ここではまるめない）。数字が振れる場合には落ち着くまで待つ。
- \*2 で述べたようにできるだけ多くの試験片を作成して質量を測定し、質量ができるだけ近似したものを試料として用いる。試験は 3 試行以上、できれば 5 試行以上で行うとよい。
- \*3 硫酸デシケーター内に試料を置く場合は、ビーカーなどを利用するとよい（下記写真参照）。また、天秤で質量を測定するときもビーカーを用いるとよい。



- \*4 23 時間など若干短くてもよい。また、数日間放置してもよい。

### 植物油への溶出

試料の表面積  $1 \text{ cm}^2$  あたり 2 ml のオリーブ油を恒温水槽を用いて所定温度<sup>\*1</sup> に加温して試料を浸漬し、恒温水槽で所定温度<sup>\*1</sup> に保ちながら 30 分間静置したのち試料を取り出す。その後、試料に付着したオリーブ油をろ紙などで除去し<sup>\*2</sup>、さらに試料をろ紙などに挟んで重し<sup>\*3</sup> をのせ数時間静置する操作を、ろ紙などにオリーブ油が付着しなくなるまで繰り返す

<sup>\*4</sup>。

【注意】

- \*1 今回の共同試験ではポリエチレン及びポリプロピレンは80、天然ゴムは40。
- \*2 「ろ紙など」としてオリブ油の除去に適しているのは、ろ紙、キムワイプ、キムタオルなど繊維が付着し出にくく吸油性が高いもの。力強く擦ると試料表面を傷つけたり、紙の繊維が付着するなどして試料質量に影響を与える可能性があるため、試料をこれらに挟んで抑えることにより、表面に付着したオリブ油を染みこませて除去する。ろ紙などにオリブ油が付着しなくなるまで繰り返す。
- \*3 重しについては特に指定しない。例えば約10kg程度のコピー用紙、本などを重しとして使用する（下記写真参照）。



試料をキムタオルで挟み込み重しをのせたもの

- \*4 付着の有無については目視により判断する（下記写真参照）。  
- 油抜きの場合 -



オリブ油の除去が不十分な状態

オリブ油の除去が終了した状態

### 溶出後の試料質量の測定

オリブ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する。溶出前の試料質量の測定と同様に操作し、質量差が 0.5 mg 以下になった質量を溶出後の試料質量 ( $W_b$  mg) とする。

#### 【注意】

$W_a - W_b$  は一般にマイナスになる。

### 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 を加えて密栓する。40 °C の恒温振とう水槽で振とう<sup>\*1</sup>しながら 120 分間抽出し、抽出液をナスフラスコに移す<sup>\*2</sup>。ロータリーエバポレーターで濃縮し窒素気流下で乾固する。

#### 【注意】

\*1 広口瓶は密栓できるものを使用。振とうは目安として 50 ~ 100 往復/1 分間



\*2 試料を広口びんから取り出し、デカンテーションにより抽出液を回収する。この場合、試料や広口びんの洗い込みはしない(内標準とオリブ油の比率から算出するので全量である必要はない)。

### 植物油のメチルエステル化

で乾固して得られた残渣にヘプタン 10 ml を加えて溶解し<sup>\*1</sup>、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 分間振とうする<sup>\*2</sup>。これに水 5 ml 及び酢酸 0.5 ml を加えて 5 分間振とうした後、試験管等に移し静置する。

#### 【注意】

\*1 溶解しにくい場合は超音波を使用してもよい。

\*2 目安として 50 ~ 100 往復/1 分間

## 植物油の定量

ヘプタン層を GC-FID (又は GC/MS) に注入し、得られたガスクロマトグラムからオリブ油の定量用ピーク (オレイン酸メチル) と内標準ピーク (ヘプタデカン酸メチル) の面積比を求め、内標準法により試料中に残存するオリブ油量 ( $W_c$  mg) を求める。検量線<sup>\*1</sup> はオリブ油に内標準溶液 10 ml を加えて濃縮乾固後、及び の操作を行い作成する。なお、検量線範囲は 0.05 ~ 1500 mg とし、 $W_c$  が検量線の中点付近となるように 3 点以上の濃度点数により作成する<sup>\*2,3</sup>。

### 【注意】

- \*1 オリブ油は電子天秤を用いて直接採取するか、または 1 mg/ml オリブ油溶液 (オリブ油 50 mg をヘプタンで 50 ml に定容) を調製して必要量を採取し、内標準溶液 10 ml を加えて濃縮乾固し、メチルエステル化後 GC-FID または GC/MS で測定する。横軸にはオリブ油量 (mg)、縦軸にはオレイン酸メチルとヘプタデカン酸メチルのピーク の面積比をとる。
- \*2 検量線標準溶液は試料測定の前後に各 1 回注入するか、前または後に 1 回の場合は適宜一定濃度 (検量線の中位または試料中のオリブ油量に近いもの) の標準溶液を注入して機器の検出感度が変わっていないことを確認すること。
- \*3 検量線の濃度範囲及び間隔は必要に応じて任意でよい。今回は 0.05mg ~ 200mg で十分であろう。いずれの  $W_c$  も検量線の中で直線性が良好な部分にくるようにする。試料毎に濃度範囲の異なる検量線を作成してもよい。

## GC-FID 測定条件

カラム：Polyethylene glycol 系 (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.5 μm) <sup>\*1</sup>

カラム温度：100 (2 min), 100 ~ 250 (20 /min, 昇温), 250 (5 min)

注入口温度：250 ; 検出器温度：250 ; スプリット比：1:50

キャリアガス流量：ヘリウム 2.0 ml/min ; 検出器：水素炎イオン化検出器 (FID) <sup>\*2</sup>

### 【注意】

- \*1 食品衛生法のポリスチレン規格揮発性物質で使用しているものと同等のカラム。  
例：DB-WAX (Agilent Technologies 社)
- \*2 GC/MS を使用する場合には、GC-FID 測定条件を参考にそれぞれの装置にあわせて変更してもよい。

## 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<sup>\*1</sup> により算出する。

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

$W_a$  : 溶出前の試料質量 (mg)

$W_b$  : 溶出後の試料質量 (mg)

$W_c$  : 溶出後の試料中に残存するオリブ油量 (mg)

S : 試料の表面積 ( $\text{cm}^2$ ) <sup>\*2</sup>

**【注意】**

\*1  $W_a - W_b$  はマイナスの値となることが多い。

\*2 ポリエチレン及びポリプロピレンは  $200 \text{ cm}^2$ 、天然ゴムは  $18 \text{ cm}^2$  となる。

**J 結果の報告**

記入例を参考にして報告シート(1~3)を記入する。報告シート3は検体(材質)ごとに記入し、1検体につき3試行の結果を報告する\*1。報告は  $W_a$ 、 $W_b$ 、 $W_c$ 、 $W_a - W_b + W_c$ 、植物油総溶出物量及びそれらの測定日とする。 $W_a$  及び  $W_b$  は天秤の表示通り(0.1 または 0.01 mg の単位)、 $W_c$  は 0.01 mg の単位まで記載する。

試験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。

**【報告シートの内容】**

報告シート1...試薬等の情報、感想など

報告シート2...測定条件

報告シート3...定量結果

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)で研究責任者へ提出する。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。

**【注意】**

\*1 適切な状態で試験が行われていないと判断される場合は再試験を行う。