

## <その1> 紙製品中の蛍光物質の検査法改良に関する検討

研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所  
研究代表者 六鹿 元雄 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 山口 未来 国立医薬品食品衛生研究所

### A. 研究目的

紙製品は、白く見せるために蛍光増白剤などの蛍光染料（蛍光物質）が添加されることがある。昭和36年4月28日衛食第109号厚生省食品衛生課長通知により、蛍光物質は化学的合成品たる着色料とされ、溶出するおそれがない場合を除き食品用の器具・容器包装の製造に使用してはならないこととされた<sup>1)</sup>。また昭和45年9月16日環食第402号厚生省食品衛生課長通知において、食生活の多様化、欧米化に伴うペーパーナプキンの使用増により、ペーパーナプキンを器具として取り扱うこととされた<sup>2)</sup>。

紙製品中の蛍光物質の試験法については、昭和46年5月8日付環食第244号厚生省食品衛生課長通知により統一検査法として示された<sup>3)</sup>。予試験として、試料に350~370nmの波長の紫外線を照射して蛍光の有無を確認し、蛍光が確認された試料を対象に以下の本試験を行う。試料は約5×5cmの大きさに切断し、100mLのアンモニア微アルカリ性水溶液(pH7.5~9)に入れ、時々おだやかに攪拌し、約10分間浸出する。ガラス綿を用いてろ過し、ろ液に希塩酸を滴下し弱酸性(pH3~5)とする。2×4cmに切断したガーゼをその液に浸漬し30分間水浴上で加温する。ガーゼを水洗してしぼった後、暗室中で紫外線を照射し蛍光の有無を目視で確認することとなっていた。

昭和30年11月16日衛食第244号の厚生省食品衛生課長通知「食品中の蛍光染料の検出法について」<sup>4)</sup>では「青白色の強い蛍光」と記載されていたが、昭和46年の統一試験法に改正されたときに記載が変更された。しかし、蛍光物質は極微量でも紫外線照射により蛍光

発光を目視で確認できるため、原料の古紙由来で混入した極微量の蛍光物質が検出され、違反事例が生じた。

そこで、厚生労働省は平成16年1月17日付食安基発第0107001号/食安監発第0107001号により検査法の新たな実施要領を通知した<sup>5,6)</sup>。試料とする検体は食品に直接接触する部分が基本であること、検査のばらつきを防ぐため、ろ液にガーゼを浸漬する際のpHは3~3.5とすること、蛍光の判定は明らかな青白色の強い蛍光を発することとし、参考事例として蛍光物質を含む場合の写真を掲げこれを参照すること、蛍光が明確に判定しにくい場合は事業者等に確認したうえで判断することを原則とした。これにより、蛍光物質の溶出の有無の判別が容易となった。

しかし、照射する紫外線の波長や強度、観察する場所の明るさなどによって観察される蛍光の強さが異なる可能性があり、試験者や試験機関により判定結果に差が生じることが危惧される。また、現行の公定法では予試験として、まず試料に直接紫外線を照射して蛍光物質の使用の有無を判断しているが、その判断基準は明確に示されていない。

そこで、試験者または試験機関間における判定精度の向上を目的として、分析機器を用いた分析法の検討を行うとともに、蛍光の強さを同じ条件下で比較するための標準試料の作製を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

紙製品40検体。内訳は、食品用器具・容器包装26検体(ペーパーナプキン、コーヒーフ

フィルター、ケーキ用箱など)および食品用途以外のその他紙製品として印刷用紙6検体、原紙5検体、一般紙製品3検体(ペーパータオル、紙製箱)である。これらは東京都内の販売店、インターネット等で購入もしくは都内や海外のレストラン、カフェ等で入手したものである。試料の種類および用途について表1にまとめた。なお、試料番号はNo.1~40とし、試料から調製したガーゼ試料番号はNo.1G~40Gとした。

## 2. 試薬等

アンモニア：28%アンモニア水、特級、和光純薬工業(株)製

塩酸：35%、有害金属測定用、シグマアルドリッチ社製

超純水：Gradient A10 (MILLIPORE 社製)で精製した MilliQ 水を用いた。

Kayaphor: Kayaphor SN conc., 日本化薬(株)

製

Kayaphor 原液 (1,000 µg/mL): Kayaphor 50 mg を採り、超純水を加えて 50 mL に定容して調製した。褐色クイック気密保存瓶(関東化学(株)製)に入れ室温で保存した。

Kayaphor 溶液: Kayaphor 原液を pH 3.1 の塩酸もしくは 0.003% HCl/MeOH 溶液で適宜希釈して、0.01~50 µg/mL の Kayaphor 溶液とした。

## 3. 装置

紫外線ランプ: ハンディー UV ランプ SLUV-6 (主波長 365 nm、光源からの距離 50 mm 時の紫外線強度 1,274 µW/cm<sup>2</sup>) アズワン(株)

分光蛍光光度計: F-7100、(株)日立ハイテクサイエンス製(図1)

TLC ビジュアライザー: TLC visualizer、CAMAG 社製(図1)

表1 試料情報

試料番号	種類	用途	試料番号	種類	用途
1	食品用	ペーパーナプキン	21	食品用	紙コップ
2	食品用	ペーパーナプキン	22	食品用	フライドポテト用紙袋
3	食品用	ペーパーナプキン*	23	食品用	サンドイッチ用箱
4	食品用	ペーパーナプキン*	24	食品用	クッキングシート
5	食品用	ペーパーナプキン*	25	食品用	焼菓子用紙型
6	食品用	ペーパーナプキン*	26	食品用	和菓子用箱
7	食品用	ペーパーナプキン*	27	その他	メモ用紙
8	食品用	ペーパーナプキン*	28	その他	メモ用紙
9	食品用	ペーパーナプキン*	29	その他	メモ用紙
10	食品用	コーヒーフィルター	30	その他	コピー用紙
11	食品用	コーヒーフィルター	31	その他	コピー用紙
12	食品用	コーヒーフィルター	32	その他	レポート用紙
13	食品用	ケーキ用箱	33	その他	原紙
14	食品用	ケーキ用箱	34	その他	原紙
15	食品用	ケーキ用箱	35	その他	原紙
16	食品用	ケーキ用台紙	36	その他	原紙
17	食品用	ケーキ用台紙	37	その他	原紙
18	食品用	天ぶら用敷紙	38	その他	ペーパータオル
19	食品用	天ぶら用敷紙	39	その他	ペーパータオル
20	食品用	紙コップ	40	その他	一般用箱

試料番号1~26は食品用途の製品、27~40は食品用途以外の製品

\*入手先は海外

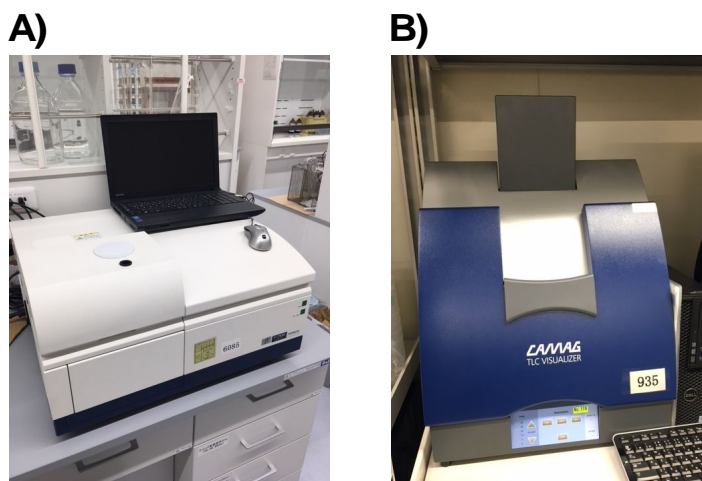


図1 装置写真

A) 分光蛍光光度計, B) TLC visualizer

## 4. 測定

### 1) 公定法に準じた蛍光の有無の確認

公定法<sup>3,5,6)</sup>に準じて試験を行った。ただし、試料量、溶媒量は半量で行い、ガーゼの水浴上での加温は60で行った。また、紫外線の有無の確認において弱い蛍光が見られたものは、無ではなく弱い蛍光と記載した。

予試験：試料に紫外線ランプを用いて約30 cm離れたところから365 nmの紫外線を照射し目視により紫外線の有無を確認した。

本試験：5×2.5 cm (12.5 cm<sup>2</sup>)の大きさに切断した試料を50 mLのアンモニア微アルカリ性水溶液(0.1%アンモニア水でpH 7.5~9に調整したもの)に入れ、時々、おだやかに攪拌し、約10分間浸出後、ガラス綿でろ過した。ろ液に10%塩酸を加えpH 3~3.5に調整した後、ガーゼ(2×4 cm)を浸漬し60で30分間加温した。ガーゼを超純水で洗浄し、しばったのち、室温暗所で自然乾燥させた。以後これを本研究におけるガーゼ試料とした。

ガーゼ試料の蛍光の有無は、紫外線ランプを用いて約30 cm離れたところから365 nmの紫外線を照射し目視により確認した。試料、ガーゼ試料ともに蛍光が観察された場合は、参考事例として示されている写真と比較し、

これと同等以上と判断した場合は強い蛍光、これよりも低いと判断した場合は弱い蛍光とした。

### 2) TLC ビジュアルライザーを用いた蛍光の有無の確認

試料もしくはガーゼ試料を装置ステージ上に置き、366 nmの紫外線を照射したときの蛍光の強さを確認した。露光時間は、試料の場合は200マイクロ秒(ms)、ガーゼ試料の場合は500 msとした。試料、ガーゼ試料ともに蛍光が観察された場合は、参考事例として示されている写真と比較し、これと同等以上と判断した場合は強い蛍光、これよりも低いと判断した場合は弱い蛍光とした。

### 3) 分光蛍光光度計を用いた蛍光強度の測定

試料は紙製品を5×2.5 cm程度の大きさに切断したもの、ガーゼ試料は二つ折りにして石英プレートで挟み込んだものを、固体試料固定用セルにセットした(図2)。ホトマル電圧を400 Vに設定し、励起波長(Ex)を366 nm、蛍光波長(Em)を450 nmの蛍光強度を測定した。

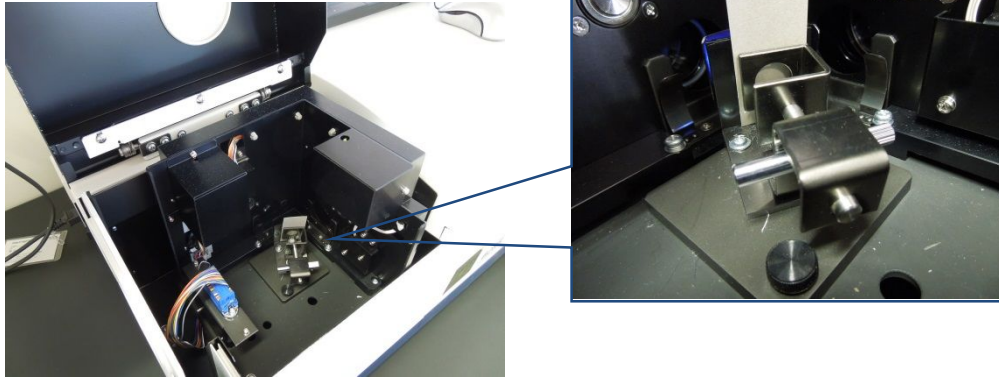


図2 分光蛍光光度計を用いた紙試料の測定  
右は拡大図

## C. 研究結果及び考察

### 1. 測定条件の検討

#### 1) TLC ビジュアルライザー

TLC ビジュアルライザーは観察された蛍光強度を数値化することはできないが、UV 照射されたガーゼ試料を直視する必要がなく、その画像をデータとして保存しておくことも可能である。そのため、再確認や過去の試料との比較も容易である。そこで、TLC ビジュアルライザーを使用するために、測定条件の検討を行った。

紫外線ランプで照射した際に目視で観察された蛍光の状態と TLC ビジュアルライザーで観察された蛍光の状態を極力等しくするため、TLC ビジュアルライザーにおける蛍光照射の露光時間の最適化を行った。

試料には、強い蛍光が観察されたものとして No.3 (ペーパーナプキン)、弱い蛍光が観察されたものとして No.19 (天ぷら用敷紙)、蛍光が観察されなかったものとして No.1 (ペーパーナプキン) を用いた。ガーゼ試料には、強い蛍光が観察されたものとして No.33G (原紙)、弱い蛍光が観察されたものとして No.34G (原紙)、蛍光が観察されなかったものとして No.1G (ペーパーナプキン) を用いた。

それぞれ、露光時間を 10、20、50、100、

200、500 ms としたときの画像 (図3) と目視の結果を比較し、最適な露光時間を決定した。その結果、試料については露光時間 200 ms、ガーゼ試料については露光時間 500 ms としたときの蛍光が目視における蛍光とほぼ同等であった。そこで、蛍光照射の露光時間を試料では 200 ms、ガーゼ試料では 500 ms に設定し、すべての試料に対して、試料およびガーゼ試料の蛍光の強さを確認した。

なお、本報告書内で示した TLC ビジュアルライザーによる撮影画像は実際に観察されるものとはやや異なることから、あくまで参考として収載する。

#### 2) 分光蛍光光度計

分光蛍光光度計は、蛍光の強さを数値化できるため、試料間の蛍光強度の強弱を客観的に比較することができる。しかし、得られる値は相対的なものであるため、同じメーカーの同型の装置であっても結果の値が異なる。また、蛍光物質の種類によって励起波長や蛍光波長が異なることにも留意する必要がある。

紫外線を照射して目視で蛍光が確認された試料を固体試料固定用セルにセットし、励起波長 200~500 nm、蛍光波長 200~600 nm の三次元蛍光スペクトルを測定した。その結果、強い蛍光が観察された No.3 (ペーパーナプキ

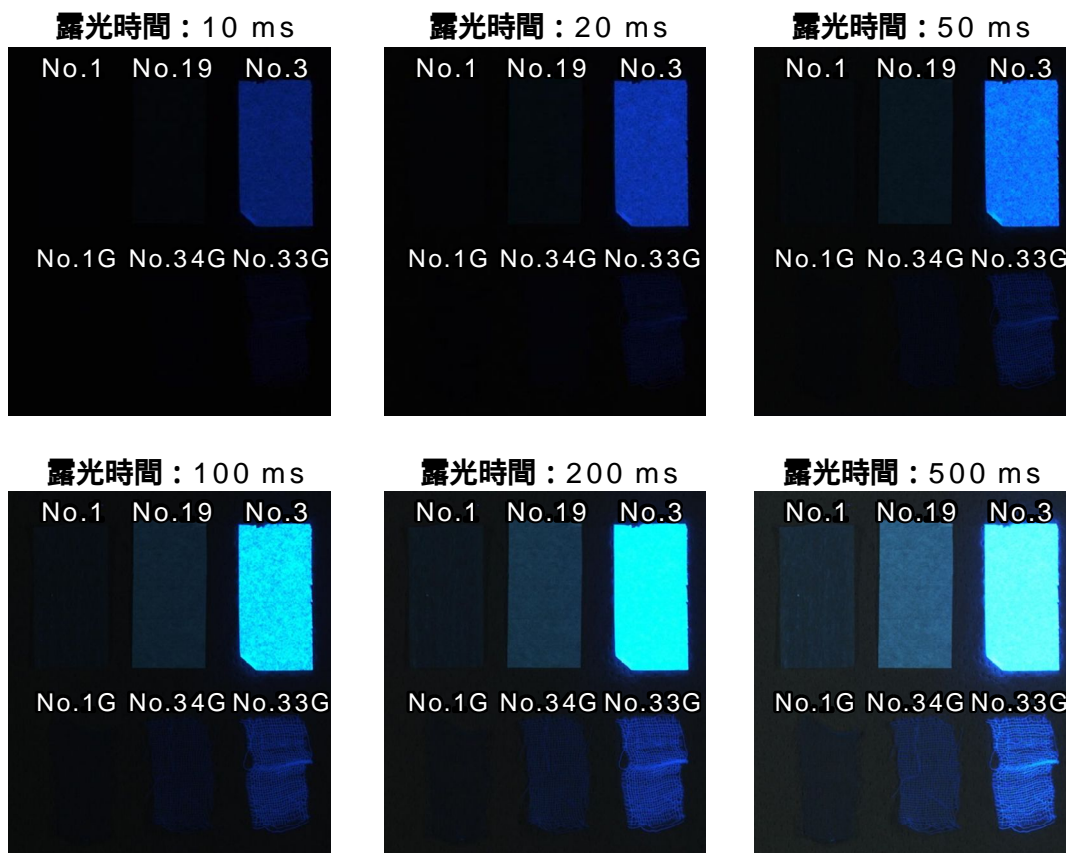


図3 TLC ビジュアライザーにおける露光時間の比較

No.1 および No.1G : 蛍光無し

No.19 および No.34G : 弱い蛍光がある

No.3 および No.33G : 強い蛍光がある

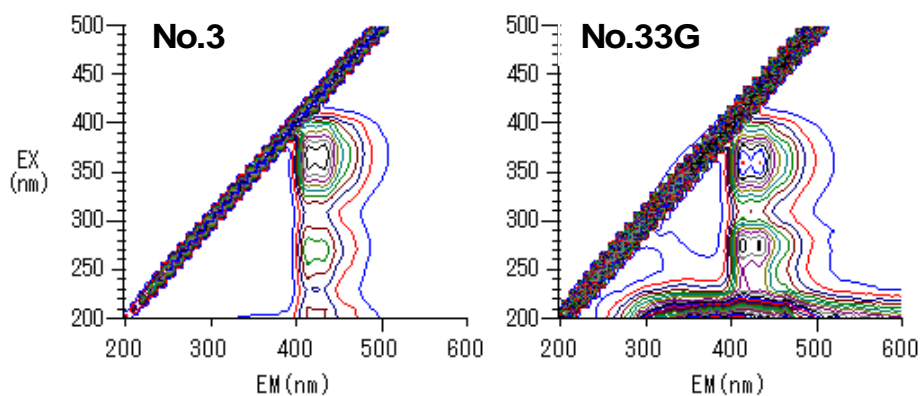


図4 試料 (No.3) およびガーゼ試料 (No.33) の三次元蛍光スペクトル

ン) では励起波長 360~370 nm、蛍光波長 400~450 nm にピークが認められた (図4)。ガーゼ試料 No.33G (原紙) においてもほぼ同じ励起および蛍光波長にピークを認めた。そこで、試料およびガーゼ試料の蛍光強度を測

定する際の励起波長は、TLC ビジュアライザーと同じ 366 nm とした。一方、蛍光波長については、一般に紫色か紫に近い青色として認識される波長である 415 および 435 nm 付近の蛍光強度が強かった。しかし、公定法で

は「青白色の強い蛍光」を確認することとされていることから、今回の検討では一般的に青白色の光として認識される波長である 450 nm における蛍光強度を測定した。

測定の際のばらつきを確認するため、紫外線を照射して目視で蛍光が確認された試料 No.36 (原紙) およびガーゼ試料 No.8G (ペーパーナプキン) をそれぞれ 5 回繰り返し測定した。その結果を表 2 に示した。

試料 No.36 では繰り返し測定の相対標準偏差は 1.5% と小さく、測定の際のばらつきはほとんどなかった。一方、ガーゼ試料は石英プレートに挟み込んで測定したが、そのまま折り返さずに測定すると、蛍光強度の相対標準偏差が 9.6% とやや大きかった。これは、ガーゼ試料が網状であるためと考えられた。そこで、二つ折りにしたのちに同様に石英プレートに挟み込んで測定したところ、相対標準偏差は 2.8% となり、安定した結果が得られ、蛍光強度が約 2 倍となった。そこで、ガーゼ試料は二つ折りにして測定することとした。

表 2 分光蛍光光度計の繰り返し測定における測定値のばらつき

繰り返し	No.36	No.8G	
		折りなし	二つ折り
1	2117	430	762
2	2178	369	732
3	2194	377	765
4	2130	342	783
5	2145	423	787
平均値	2153	388	766
標準偏差	32	37	22
相対標準偏差	1.5	9.6	2.8

### 3. ガーゼ試料における公定法と分析機器による試験結果の比較

ガーゼ試料 40 検体の公定法および TLC ビジューライザーによる確認結果、ならびに分光蛍光光度計による蛍光強度を表 3 に示した。

公定法による目視の結果では、食品用製品

26 検体中 3 検体のガーゼ試料において強い蛍光が確認されたが、いずれも海外で入手したペーパーナプキンであり、国内品では強い蛍光が確認された検体は存在しなかった。一方、食品用以外の紙製品では、メモおよびコピー用紙 3 検体、原紙 1 検体、ペーパータオル 1 検体で強い蛍光が確認された。また、7 検体で弱い蛍光が観察され、蛍光が観察されなかったのは 2 検体のみであった。

TLC ビジューライザーを用いてこれらのガーゼ試料の蛍光の強さを観察したところ、その結果は目視の試験結果と全て一致した。

同じガーゼ試料を用いて分光蛍光光度計により蛍光強度を測定したところ、蛍光強度は 19~588 の間に分布しており、公定法や TLC ビジューライザーで強い蛍光が確認された 8 検体では 206~588 と高く、弱い蛍光が確認された 7 検体では 48~99、蛍光無と確認された 25 検体では 19~44 と低かった。すなわち、目視で強い蛍光が確認されたガーゼ試料の蛍光強度は 200 以上であったのに対し、蛍光が確認できないまたは弱かったガーゼ試料の蛍光強度は 100 未満であった。このように、目視での試験結果と蛍光強度はよく一致していた。しかし、前述のように得られる蛍光強度の値は相対的な値であるため、分光蛍光光度計を試験に用いるためには、標準試料との比較が必要と考えられた。

### 4. 判定のための標準ガーゼ試料の作製

合否判定を行う場合、不適合とする「明らかに強い蛍光」をどのように判断するかについては個人差や試験機関による差異が生じる可能性がある。また、公定法においてガーゼ試料の判別のために「強い蛍光」を示す写真が参考事例として示されているが、紫外線ランプの波長や強度により観察される蛍光の状態が異なるため、同じ条件下で比較できる標準試料が望まれる。

また、TLC ビジューライザーや分光蛍光光

表3 ガーゼ試料の公定法と分析機器による蛍光の有無または蛍光強度の比較

試料番号	種類	結果**			試料番号	種類	結果**		
		公定法	TLC ビジュア ライザー	分光蛍光 光度計			公定法	TLC ビジュア ライザー	分光蛍光 光度計
1G		x	x	34	21G	x	x	24	
2G		x	x	31	22G	x	x	26	
3G		○	○	211	23G	x	x	26	
4G		○	○	417	24G	x	x	21	
5G		x	x	37	25G	x	x	20	
6G		x	x	31	26G	x	x	44	
7G		x	x	33	27G	x	x	34	
8G		○	○	588	28G	○	○	206	
9G		x	x	29	29G	○	○	452	
10G	食品用	x	x	21	30G	○	○	262	
11G		x	x	24	31G	x	x	33	
12G		x	x	20	32G			99	
13G		x	x	26	33G	○	○	430	
14G		x	x	24	34G			89	
15G		x	x	28	35G			58	
16G		x	x	25	36G			63	
17G		x	x	19	37G			65	
18G		x	x	21	38G	○	○	269	
19G		x	x	20	39G			79	
20G		x	x	20	40G			48	

\* 海外にて入手

\*\* 目視および TLCビジュアライザーの結果:○=強い蛍光を確認, ○=弱い蛍光を確認, x = 蛍光無し

度計を活用する場合には、参考事例の写真と比較対象にすることは難しく、標準試料が必要となる。

そこで、日本国内で紙用途の蛍光増白剤として広く使用されているスチルベン系蛍光増白剤である Kayaphor をガーゼに染着させた標準ガーゼ試料の作製を試みた。標準試料の作製方法として、蛍光物質を溶解した溶液をシリンジなどで紙に均一に塗布する方法<sup>7,8)</sup> やろ紙を溶液に浸漬する方法<sup>9)</sup> がある。本研究では、後者を参考にし、公定法に準じて浸漬させ染着した。

希塩酸で pH 3 に調整した 10 µg/mL の Kayaphor 溶液にガーゼ(2×4 cm)を浸漬し、公定法と同様に操作し、作製した標準ガーゼ試料と紫外線照射で強い蛍光を示した3種類のガーゼ試料の三次元蛍光スペクトルを比較

した(図5)。いずれも励起波長 360~370 nm、蛍光波長 400~450 nm のほぼ同じ位置にピークが認められ、Kayaphor または類似の蛍光物質であることが確認された。そこで、Kayaphor 溶液を用いて最適な蛍光を示す標準ガーゼ試料を作製することとした。

0~1 µg/mL の濃度の Kayaphor 溶液で作製した標準ガーゼ試料の TLC ビジュアライザーによる蛍光の写真を図6に示した。各濃度の標準ガーゼ試料を公定法および TLC ビジュアライザーによる判定結果と分光蛍光光度計における蛍光強度を表4にまとめた。

目視や TLC ビジュアライザーで染着にばらつきはみられず、分光蛍光光度計による蛍光強度は濃度依存的に増加した。公定法および TLC ビジュアライザーによる判定結果は一致し、0 µg/mL では蛍光無、0.01 µg/mL で

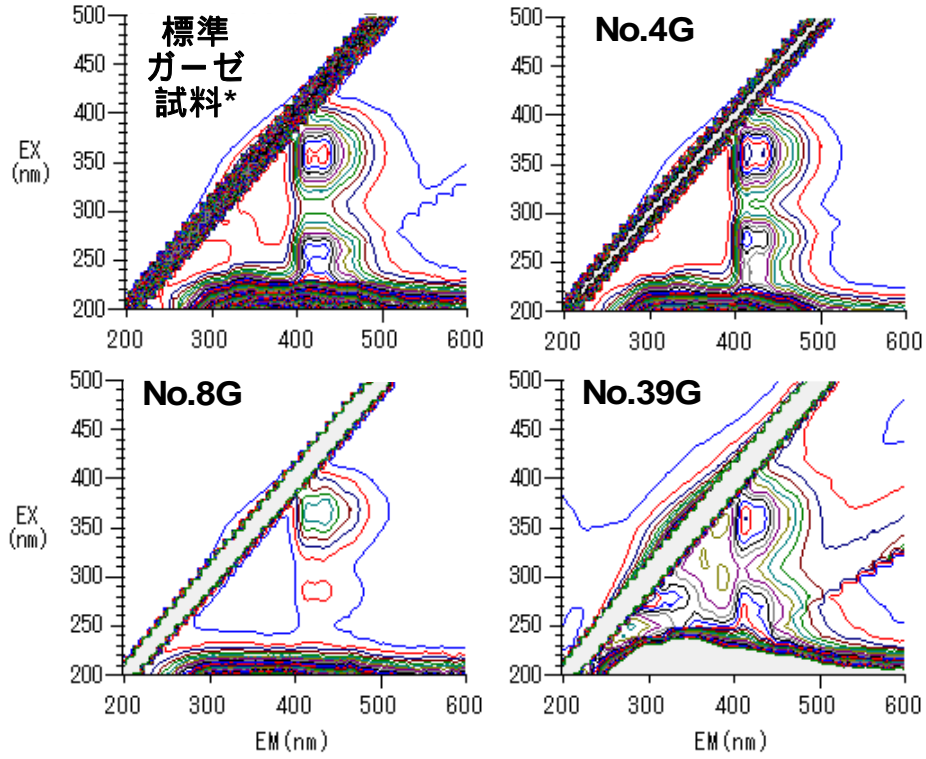


図5 標準ガーゼ試料と代表的なガーゼ試料の三次元蛍光スペクトルの比較  
 \*標準ガーゼ試料は 10  $\mu\text{g/mL}$  Kayaphor 溶液で作製したものの

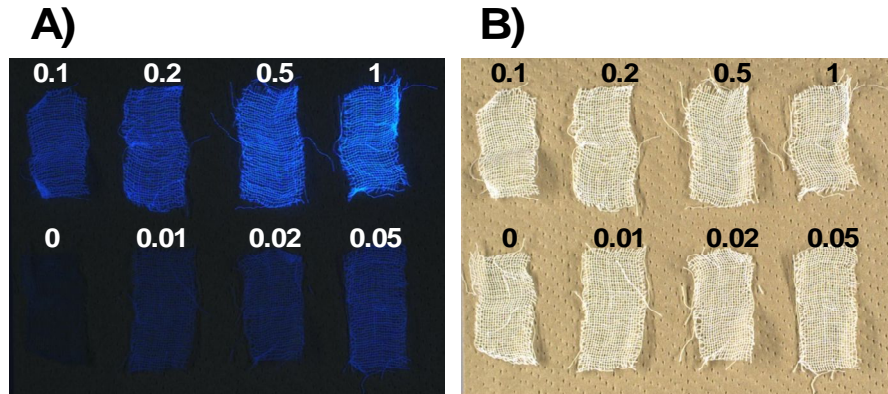


図6 TLC ビジュアライザーによる標準ガーゼ試料の写真\*  
 A) 露光時間 500 ms、B) 蛍光照射なし、数値は Kayaphor 溶液濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )  
 \*実際の見え方とはやや異なるため参考とする



表4 標準ガーゼ試料の調製濃度と公定法および分析機器による  
蛍光の有無または蛍光強度の比較

濃度* ( $\mu\text{g/mL}$ )	公定法**	TLC ビジュア ライザー**	蛍光分光 光度計***
0	×	×	44
0.01			133
0.02	○	○	200
0.05	○	○	335
0.1	○	○	427
0.2	○	○	579
0.5	○	○	1268
1	○	○	1813

\* Kayaphor 溶液濃度

\*\* 目視および TLC ビジュアライザーの結果:

○ = 強い蛍光を確認, ○ = 弱い蛍光を確認, × = 蛍光無し

\*\*\* 数値は Ex: 366 nm, Em: 450 nm における蛍光強度

は弱い蛍光、0.02  $\mu\text{g/mL}$  以上では強い蛍光が確認され、特に 0.1  $\mu\text{g/mL}$  以上では非常に強い蛍光がみられた。通知の参考事例の写真<sup>5)</sup>と比較したところ、0.02  $\mu\text{g/mL}$  が最も近かった。また、この標準ガーゼ試料の分光蛍光光度計における蛍光強度は 200 であり、強い蛍光が確認されたガーゼ試料の蛍光強度 (206~588) の最も低い値とほぼ一致していた。したがって、0.02  $\mu\text{g/mL}$  の Kayaphor 溶液で調製したものが標準ガーゼ試料として適当と判断された。

## 5. 予試験と本試験の試験結果の比較

公定法では、試料の予試験を行ったのち、蛍光が確認された試料を対象に本試験を行うこととしている。そこで本研究で用いた試料を用いて予試験を実施し、そのときの公定法および TLC ビジュアライザーによる判定結果、ならびに蛍光強度を表 5 に示した。

その結果、公定法および TLC ビジュアライザーで目視により強い蛍光があると判断した 17 試料の蛍光強度は 2,360 ~ 10,000 以上であった。一方、目視で弱い蛍光であった 10 試料では蛍光強度は 101 ~ 1,400、または蛍光が確認できなかった 13 試料の蛍光強度は 44 ~ 370 であった。

次に、予試験における試料の結果と本試験におけるガーゼ試料の結果を比較した(表 6)。

予試験で強い蛍光が確認された試料は 17 検体あった。このうちガーゼ試料でも強い蛍光が確認されたのは 8 検体、弱い蛍光が確認されたのは 6 検体、蛍光が確認されなかったのは 3 検体であった。一方、蛍光が弱かった試料は 10 検体、蛍光が確認されなかったのは 13 検体あり、これら 23 検体の全てのガーゼ試料で蛍光は確認されなかった。すなわち、予試験において蛍光が確認されないまたは弱い蛍光が確認された試料については本試験を実施する必要は無く、強い蛍光を発する試料のみを対象に本試験を実施すれば良いことが確認された。

## 6. 予試験用標準試料の作製

予試験は厳密な判定を行うわけではないが、標準試料がある方が判断しやすい。また、分光蛍光光度計で予試験を行う場合には標準試料が必要である。そこで、予試験についても標準試料(予試験用標準試料)の作製を試みた。

予試験用標準試料は、ろ紙(桐山ろ紙、5C、21 mm)を用いて作製した。ただし、水溶液では乾燥に長時間を要し、染着が不均一となったことから、0.003%塩酸含有メタノールを用いて Kayaphor 溶液を調製し、ろ紙に染着させた。1  $\mu\text{g/mL}$  の Kayaphor 溶液を用いて調製した予試験用標準試料と紫外線照射で強い蛍

表5 予試験の公定法と分析機器による蛍光の有無または蛍光強度の比較

試料番号	種類	結果**			試料番号	種類	結果**		
		公定法	TLC ビジュア ライザー	分光蛍光 光度計			公定法	TLC ビジュア ライザー	分光蛍光 光度計
1	食品用	x	x	45	21	食品用			290
2		x	x	52	22		x	x	370
3		○	○	> 10,000	23				514
4		○	○	6,490	24		x	x	103
5				151	25		x	x	211
6		x	x	44	26				1,340
7		x	x	52	27		○	○	4,677
8		○	○	5,040	28		○	○	2,450
9		x	x	80	29		○	○	8,534
10		x	x	246	30		○	○	> 10,000
11		x	x	95	31	○	○	2,970	
12				137	32	○	○	3,870	
13				929	33	その他	○	○	6,380
14				1,460	34		○	○	3,570
15		x	x	181	35		○	○	3,360
16				490	36		○	○	2,360
17		x	x	69	37		○	○	5,580
18				129	38		○	○	6,590
19				101	39		○	○	3,160
20		x	x	318	40		○	○	5,110

\* 海外にて入手

\*\* 目視および TLC ビジュアライザーの結果: ○ = 強い蛍光を確認, = 弱い蛍光を確認, x = 蛍光無し

表6 予試験および本試験結果の比較

予試験 (試料)		本試験 (ガーゼ試料)	
結果	検体数	結果	検体数
○	17	○	8
			6
		x	3
	10	○	0
			0
		x	10
x	13	○	0
			0
		x	13

○ = 強い蛍光を確認, = 弱い蛍光を確認, x = 蛍光無し

光を示した試料の三次元蛍光スペクトルを比較したところ(図7) ガーゼ試料と同様にいずれの試料においても励起波長 350~370 nm、蛍光波長 400~450 nm のほぼ同じ位置にピークが認められ、Kayaphor または類似の蛍光物質の使用が確認された。そこで、Kayaphor 溶液を用いて最適な蛍光強度を示す予試験用標準試料を作製した。

0.01 ~ 50 µg/mL の濃度の Kayaphor 溶液を用いて調製した予試験用標準試料の TLC ビジュアライザーにおける蛍光の状態を図8、公定法および TLC ビジュアライザーによる判定結果と分光蛍光光度計における蛍光強度を表7にまとめた。紫外線ランプの照射および TLC ビジュアライザーにおいて、0.05 µg/mL 以下では蛍光は確認できず、0.1~0.5 µg/mL では弱い蛍光、1 µg/mL 以上で強い蛍光が確認された。一部の試料において染着にばらつきがみられたが、ほとんどは均一に染着できた。分光蛍光光度計による蛍光強度は0.05 µg/mL 以下ではブランクの蛍光強度とあまり変わらず濃度依存性はなかったが、0.1 µg/mL 以上ではほぼ濃度依存的に増加していた。

予試験の目視の観察では試料の着色や表面加工等により蛍光の見え方が変わる場合があ

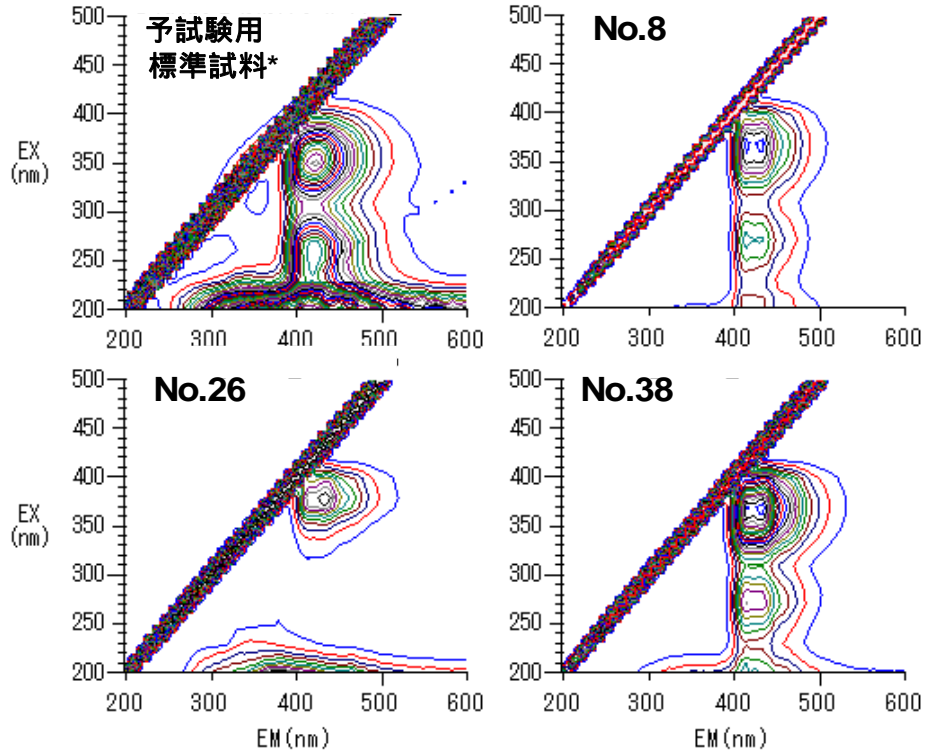


図7 予試験用標準試料と代表的な試料の三次元蛍光スペクトルの比較  
 \*予試験用標準試料は 1  $\mu\text{g/mL}$  Kayaphor 溶液で作製したもの

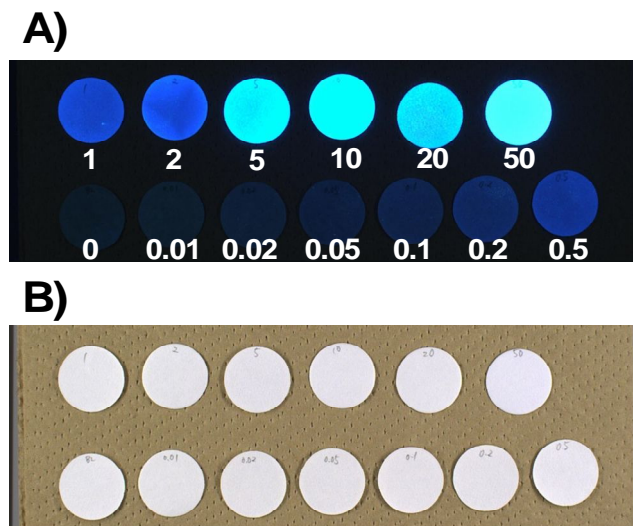


図8 TLC ビジュアライザーによる標準試料の写真\*  
 A) 露光時間 200 ms、B) 蛍光照射なし、数値は Kayaphor 溶液濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )  
 \* 実際の見え方とはやや異なるため参考とする

表7 予試験用標準試料の調製濃度と公定法および分析機器による  
蛍光の有無または蛍光強度の比較

濃度* ( $\mu\text{g/mL}$ )	公定法**	TLC ビジュア ライザー**	分光蛍光 光度計***
0	×	×	75
0.01	×	×	87
0.02	×	×	102
0.05	×	×	91
0.1			126
0.2			150
0.5			289
1	○	○	675
2	○	○	1261
5	○	○	2090
10	○	○	4178
20	○	○	6625
50	○	○	> 10000

\* Kayaphor 溶液濃度

\*\* 目視および TLC ビジュアライザーの結果:

○ = 強い蛍光を確認, = 弱い蛍光を確認, × = 蛍光無し

\*\*\* 数値は Ex: 366 nm, Em: 450 nm における蛍光強度

る。また、最終的な適否判定は溶出試験により調製したガーゼ試料で行うため、予試験用標準試料は蛍光物質を含む試料を確実に選抜できるように、強い蛍光が確認された試料の蛍光強度よりも保守的なレベルに設定するのが良いと考えられた。すなわち、強い蛍光が確認された 1  $\mu\text{g/mL}$  の Kayaphor 溶液 (蛍光強度: 675) で調製したものが予試験用標準試料として適当と考えられた。

#### D. 結論

紙製品中の蛍光物質の試験において、公定法では蛍光の有無を紫外線ランプ照射による目視で判定している。蛍光の有無の判定については、参考事例の写真が示されているが、種々の条件等により見え方が異なるため、試験者や試験機関により判定結果に差が生じることが危惧された。

食品用および一般用の紙製品 40 試料について試験を行ったところ、予試験の試料を直接測定した場合も、本試験のガーゼ試料においても、公定法による判定結果は、露光時間を調整した TLC ビジュアライザーによる判

定結果とよく一致しており、分光蛍光光度計により得られた蛍光強度との相関も見られた。すなわち、公定法の紫外線ランプの照射による目視判定のかわりに、TLC ビジュアライザーの目視判定や分光蛍光光度計の蛍光強度による判定が適用できることが示された。

しかし、いずれの方法においても、蛍光の有無の判別をより正確に行うためには比較対象となる標準試料が必須であるため、比較の対象となる標準ガーゼ試料と予試験用標準試料を作製した。

これらを用いることにより、より正確な判定が可能となり、また分光蛍光光度計を用いれば Good Laboratory Practice にも対応可能となることが期待された。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生省食品衛生課長通知‘ 蛍光染料を使用した容器包装材料・レースペーパーなどの取扱いについて ’、昭和 36 年 4 月 28 日衛食第 109 号
- 2) 厚生省食品衛生課長通知‘ 蛍光物質を使用した紙ナプキン取扱いについて ’、昭和 45

- 年 9 月 16 日環食第 402 号
- 3) 厚生省食品衛生課長通知‘ 蛍光物質を使用した器具または容器包装の検査法について ’、昭和 46 年 5 月 8 日環食第 244 号
  - 4) 厚生省食品衛生課長通知‘ 食品中の蛍光染料の検出法について ’、昭和 30 年 11 月 16 日衛食第 244 号の 2
  - 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知‘ 蛍光物質を使用した器具または容器包装の検査法について ’、平成 16 年 1 月 7 日食安基発第 0107001 号
  - 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知‘ 蛍光物質を使用した器具または容器包装の検査法について ’、平成 16 年 1 月 7 日食安監発第 0107001 号
  - 7) Chen, H. C., Wang, S. P., Hot-water and solid-phase extraction of fluorescent whitening agents in paper materials and infant clothes followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1108, 202-207 (2006)
  - 8) Kim, J. S., Kim, D. H., Kim, K., Determination of Fluorescent Whitening Agents in Paper Materials by Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33, 3971-3976 (2012)
  - 9) 加地麻衣子、江前敏晴、磯貝 明、紙に含まれる蛍光増白剤の定量方法に関する検討、*紙パ技協誌*、62, 89-94 (2008)