

<別添>

令和元年度 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
規格試験法の性能に関する研究

令和元年度
試験室間共同試験
計画書

ビスフェノール A 溶出試験

令和元年 9 月 13 日

A 目的

ビスフェノールA (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) は、ポリカーボネートの原料モノマーであり、フェノールおよび*p-tert*-ブチルフェノールはポリカーボネート製造時に添加される重合調節剤である。ビスフェノールAは、ポリカーボネートの酸化分解によっても生成するため、ポリカーボネートの材質中には、未重合体または分解物としてビスフェノールAが多少存在する。

我が国では、2008年7月、厚生労働省は食品安全委員会にビスフェノールAの食品健康影響評価を依頼し、2010年6月、食品安全委員会は中間取りまとめを行った結果、知見が不十分のためTDIの設定が保留された。今後の食品安全委員会による食品健康影響評価の結果によっては規制値等が改正される可能性が考えられる。食品衛生法では、ポリカーボネート製器具及び容器・包装について、ビスフェノールAの溶出量を 2.5 µg/mL以下、ビスフェノールA (フェノールおよび*p-tert*-ブチルフェノールを含む) の含有量を 500 µg/g 以下としており、同時に規制値への適合を判定するための試験法が告示されている (以下、告示試験法)。しかし、告示試験法における定量下限値や精度等の性能は不明である。そこで、本研究では器具・容器包装におけるビスフェノールAの試験について、告示試験法の試験室間共同試験を行い、改めて現行の告示試験法の性能を確認するとともに、規格試験法としての適用性を検証する。

また、ビスフェノールAをLC-MS又はLC-MS/MSで分析するための基礎的検討を同時に行う。

B スケジュール

実験計画の立案と調整・・・・・・・・研究代表者・解析者⇔各試験機関、第1回班会議
↓
(7月上旬)
検体の調製・・・・・・・・(一財)食品薬品安全センター
↓
検体の配付・・・・・・・・(一財)食品薬品安全センター⇒各試験機関
↓
(9月中旬に配付)
各試験機関で試験・・・・・・・・(検体配付後2ヶ月間)
↓
結果の報告・・・・・・・・各試験機関⇒研究代表者⇒解析者
↓
(11月中旬まで)
全体の結果を集約及び報告・・・・・・・・解析者による解析
↓
第2回班会議(1月予定)
報告書の作成・・・・・・・・研究代表者・解析者(1月～)

C 試験の実施に関する要件

試験を実施する際は以下の要件を満たすこと。

①試験に用いる機器及び器具は、規格試験を実施する際に使用するものであること。

試験に用いる機器及び器具類は、実際に食品衛生法の規格試験を実施する際に使用しているもの、または今後の使用が見込まれるものであること。ただし、長期間使用していない機器及び器具類を用いる場合は、事前に整備等の確認を行うこと。

②試験は、その試験法に関する経験・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。

試験は、規格試験を実施した経験のある者による実施が望ましい。経験が無いものが実施する場合は、事前に操作法、注意点等を確認しておくこと。

③試験は検体受領後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。

予定している試験は可能な限り実施すること。

突発的な他業務の遂行による遅延、機器の故障、特段の事情により試験の実施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。

試験は「I 試験手順」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。

試験に関する測定データ等は令和3年3月末日まで保存すること。

D 解析者

国立医薬品食品衛生研究所 片岡 洋平

【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。

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、さいたま市健康科学研究センター、神奈川県衛生研究所、川崎市健康安全研究所、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、大阪健康安全基盤研究所、福岡県保健環境研究所、国立医薬品食品衛生研究所、国立研究開発法人 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(東京事業所及び大阪事業所)、(一財)日本食品分析センター(多摩研究所及び彩都研究所)、(一財)食品環境検査協会、(一財)日本食品検査、(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

【注意】 試験を実施しない試験機関も含む。

②機関コード

試験を実施する機関には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。

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。

③試験を実施する試験機関

機関コード	測定機器			機関コード	測定機器		
	UV/PDA	MS	MS/MS		UV/PDA	MS	MS/MS
A	○			M	○		
B				N	○		
C	○		○	O	○		
D	○	○	○	P	○		○
E	○	○	○	Q	○		
F	○	○		R	○		
G	○			S	○		
H	○			T	○	○	○
I	○	○		U	○		
J	○	○	○	V	○		
K	○		○	W	○		○
L	○	○	○	X	○	○	

F 検体の調製及び配付

検体の調製及び配付は (一財) 食品薬品安全センターが行う。

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検体中の成分を測定し、そのピーク面積等を用いて確認する。

②安定性確認

溶出試験の検体については、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とその 3 ヶ月後に検体中の成分を測定し、そのピーク面積等を用いて確認する。

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、試薬の購入等の準備を適宜行うこと。

②配付する検体

溶出試験用（水、4%酢酸、20%エタノール、ヘプタン）：各 2 検体（計 8 検体）

ブランク溶液（水、4%酢酸、20%エタノール、ヘプタン）：各 1 検体（計 4 検体）

③検体の確認

検体受領後はただちに検体数、溶媒・検体 No の判別、検体の状態を確認し、問題があれば至急連絡すること。

④検体の保管及び管理

検体は冷蔵庫等（10℃以下）で保管し、分析時に室温に戻して使用する。

【注意】 検体は冷蔵で送付する。

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 試験手順

①試験溶液の調製

○LC-UV（もしくはLC-PDA）の場合：

- ・水、4%酢酸、20%エタノール：検体をそのまま試験溶液とする。
- ・ヘプタン：検体は20倍の濃度で配布するので、各機関においてヘプタンで20倍希釈したものを用いる。すなわち、検体5 mLを100 mL容のメスフラスコに採り、ヘプタンを加え100 mLとしたものを、公定法における溶出試験後の溶液とする。以降の操作は公定法に従い、この液25 mLを分液漏斗に移し、アセトニトリル10 mLを加え、5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を25 mL容のメスフラスコに移す。ヘプタン層にアセトニトリル10 mLを加え、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記のメスフラスコに合わせる。次いでアセトニトリルを加えて25 mLとする。これを試験溶液とする。同様に、送付するヘプタンも各機関においてヘプタンで20倍希釈し、空試験を2回実施する。この試験溶液をヘプタンのブランク試料とする。

○LC-MS および LC-MS/MS の場合：

LC-UV（もしくはLC-PDA）の場合の試験溶液（ブランク試料を含む）を「④試験溶液の定量」で指定する検量線に内挿して定量可能な濃度に水で希釈した溶液を試験溶液とする。

【注意】 ヘプタンについては空試験を実施すること。

【注意】 試験溶液のフィルターろ過については、公定法にフィルター使用の記載がないため、本計画書でもフィルター使用について記載していないが、その使用を妨げるものではない。また、LC-UV法、LC-MS法、LC-MS/MS法で試験溶液のフィルターろ過した場合は「結果報告シート1 3. 使用した試薬等」に使用したフィルター等のメーカー名と製品名を記載する。

②検量線用標準溶液の調製

○LC-UV（もしくはLC-PDA）の場合：

公定法に従う。すなわち、100 mLのメスフラスコにビスフェノールA、フェノールおよび*p-tert*-ブチルフェノールそれぞれ約10 mgを精密に採り、メタノールを加えて100 mLとする（各100 µg/mL）。この溶液1 mL、2 mL、3 mL、4 mLおよび5 mLを採り、それぞれ20 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて20 mLとする（各5、10、15、20および25 µg/mL）。これらの溶液2 mLずつを採り、それぞれ20 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて20 mLとしたもの（各0.5、1.0、1.5、2.0および2.5 µg/mL）をUV用検量線用標準溶液Aとする。また、0.5、1.0および2.5 µg/mLのUV用検量線用標準溶液Aの溶液2 mLずつを採り、それぞれ20 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて20 mLとしたものを標準溶液①と

する（各 0.05、0.1、および 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液①の 0.1、および 0.25 $\mu\text{g/mL}$ の溶液 2 mL ずつを採り、それぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて 20 mL としたものを標準溶液②とする（各 0.01、0.025 $\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液①と標準溶液②を UV 用検量線用標準溶液 B（各 0.01、0.025、0.05、0.1、および 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ）とする。

○LC-MS および LC-MS/MS の場合：

100 mL のメスフラスコにビスフェノール A 10 mg を精密に採り、メタノールを加えて 100 mL とする（各 100 $\mu\text{g/mL}$ ）。この溶液 2 mL を採り、水を加えて 20 mL とする（10 $\mu\text{g/mL}$ ）。さらにこの溶液 5 mL を採り、水を加えて 100 mL とする（0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）。この溶液 5 mL 採り、水を加えて 50 mL としたものを標準溶液③とする（0.05 $\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液③を 2 mL、3 mL、4 mL、および 10 mL 採り、それぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて 20 mL としたものを標準溶液④とする（0.005、0.0075、0.01、0.025 $\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液④の 0.005、0.01 および 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 2 mL ずつを採り、それぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて 20 mL としたものを標準溶液⑤とする（0.0005、0.001、0.0025 $\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液⑤の溶液 2 mL ずつを採り、それぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて 20 mL としたものを標準溶液⑥とする（0.00005、0.0001、0.00025 $\mu\text{g/mL}$ ）。

標準溶液③と標準溶液④を MS 用検量線用標準溶液 A（0.005、0.075、0.01、0.025、および 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ）とし、標準溶液⑤と標準溶液⑥を MS 用検量線用標準溶液 B（0.00005、0.0001、0.00025、0.0005、0.001、および 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ ）とする。

【注意】 検量線用標準溶液の濃度点は変更しないこと。

③操作条件

○LC-UV（もしくは LC-PDA）の場合：公定法に従う。

ただし、測定の順番は以下とする。

水（ブランク溶液：0 $\mu\text{g/mL}$ ）→UV 用検量線溶液 B（低濃度から高濃度の順）→UV 用検量線溶液 A（低濃度から高濃度の順）→ブランク試料（水；2 回測定）→試験溶液（水；試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定）→ブランク試料（4%酢酸；2 回測定）→試験溶液（4%酢酸；試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定）→ブランク試料（20% エタノール；2 回測定）→試験溶液（20%エタノール；試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定）→ブランク試料（ヘプタン；空試験 1 と空試験 2 の測定溶液を測定）→試験溶液（ヘプタン；試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定）→UV 用検量線溶液 A（高濃度から低濃度の順）→UV 用検量線溶液 B（高濃度から低濃度の順）

【注意】 各ブランク試料も 2 回測定する。

○LC-MS の場合：以下に従う。（※測定例を最後のページに示した。）

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲルを用いる。

カラム温度 40°C

移動相 水及びアセトニトリルの混液(7:3)から(0:10)までの濃度勾配で行い、(0:10)で保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）

対象化合物	m/z
ビスフェノール A	227

ただし、測定の順番は以下とする。

水 (ブランク溶液 : 0 µg/mL) →MS 用検量線溶液 B (低濃度から高濃度の順) →MS 用検量線溶液 A (低濃度から高濃度の順) →ブランク試料 (水 ; 2 回測定) →試験溶液 (水 ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →ブランク試料 (20%エタノール ; 2 回測定) →試験溶液 (20%エタノール ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →ブランク試料 (ヘプタン ; 空試験 1 と空試験 2 の測定溶液を測定) →試験溶液 (ヘプタン ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →MS 用検量線溶液 A (高濃度から低濃度の順) →MS 用検量線溶液 B (高濃度から低濃度の順)

【注意】各ブランク試料も2回測定する。

○LC-MS/MS の場合 : 以下に従う。(※測定例を最後のページに示した。)

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲルを用いる。

カラム温度 40°C

移動相 水及びアセトニトリルの混液(7:3)から(0:10)までの濃度勾配で行い、(0:10)で保持する。

イオン化モード : ESI (-)

主なイオン (m/z)

対象化合物	プリカーサーイオン	プロダクトイオン
ビスフェノール A	227	212 or 133

ただし、測定の順番は以下とする (LC-MS と同様)。

水 (ブランク溶液 : 0 µg/mL) →MS 用検量線溶液 B (低濃度から高濃度の順) →MS 用検量線溶液 A (低濃度から高濃度の順) →ブランク試料 (水 ; 2 回測定) →試験溶液 (水 ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →ブランク試料 (20%エタノール ; 2 回測定) →試験溶液 (20%エタノール ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →ブランク試料 (ヘプタン ; 空試験 1 と空試験 2 の測定溶液を測定) →試験溶液 (ヘプタン ; 試料 1 を 2 回測定、試料 2 を 2 回測定) →MS 用検量線溶液 A (高濃度から低濃度の順) →MS 用検量線溶液 B (高濃度から低濃度の順)

【注意】各ブランク試料も2回測定する。

④試験溶液の定量

- 1 検体につき、2 回の試験を実施する。ヘプタンの場合は、**検体を 20 倍に希釈した以降の操作を 2 回別々に同時に行うこと。同じ試験溶液を 2 回測定するわけではない。**
- 公定法の場合には UV 用検量線用標準溶液 A (各 0.5、1.0、1.5、2.0 および 2.5 µg/mL) の測定結果を検量線として定量する。LC-MS 法、LC-MS/MS 法の場合には、MS 用検量線用標準溶液 A (0.005、0.075、0.01、0.025 および 0.05 µg/mL) の測定結果を検量線として定量する。
- 絶対検量線法の一次回帰式により定量する。
- 定量は 2 回の検量線溶液の測定のどちらを用いてもよい。
- 報告する結果は検体中の濃度 (溶出試験 : µg/mL) とする。

ただし、LC-MS 法、LC-MS/MS 法では溶媒が水、20%エタノール、ヘプタンの結果を報告する。

○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「<0.5」（0.5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】 $\mu\text{g/mL}$ 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 ng/mL 単位で検量線を作成するとよい。

⑤ 検量線の確認

○②操作条件にしたがって測定した2回の検量線データについて、面積値、又は高さを報告する。

○面積値、又は高さの値は整数値を報告する。（小数点以下は四捨五入し、有効数字等を考慮する必要はない）

⑥ 選択性の確認

妨害となるピーク等が検出されないことを確認する。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2は検体の溶媒ごとに記入する。（報告シートへの記入例を参考に示す）
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

報告シート4…検量線データ

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。

K 目標値

食品衛生法の規格試験としての妥当性を確認するにあたり、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：評価の対象としない

真度：80～110%（溶出試験）

併行精度（ RSD_r ）：10%以下

室間再現精度（ RSD_R ）：25%以下

○LC-MS の測定条件例

- 装置: Waters UPLC-TQD
- カラム: Inertsil ODS4 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm
- カラム温度 40°C
- 移動相 水及びアセトニトリルの混液(7:3)から(0:10)までの濃度勾配 35 分間で行い、(0:10)で 10 分間保持する。
- 流量: 0.2 mL/min
- イオン化モード: ESI (-)
- キャピラリー電圧: 3000 V
- コーン電圧: 44 V
- ソース温度: 150°C
- 脱溶媒温度: 400°C
- コーンガス流量: 50 L/hr
- 脱溶媒ガス流量: 700 L/hr
- 注入量: 20 μL

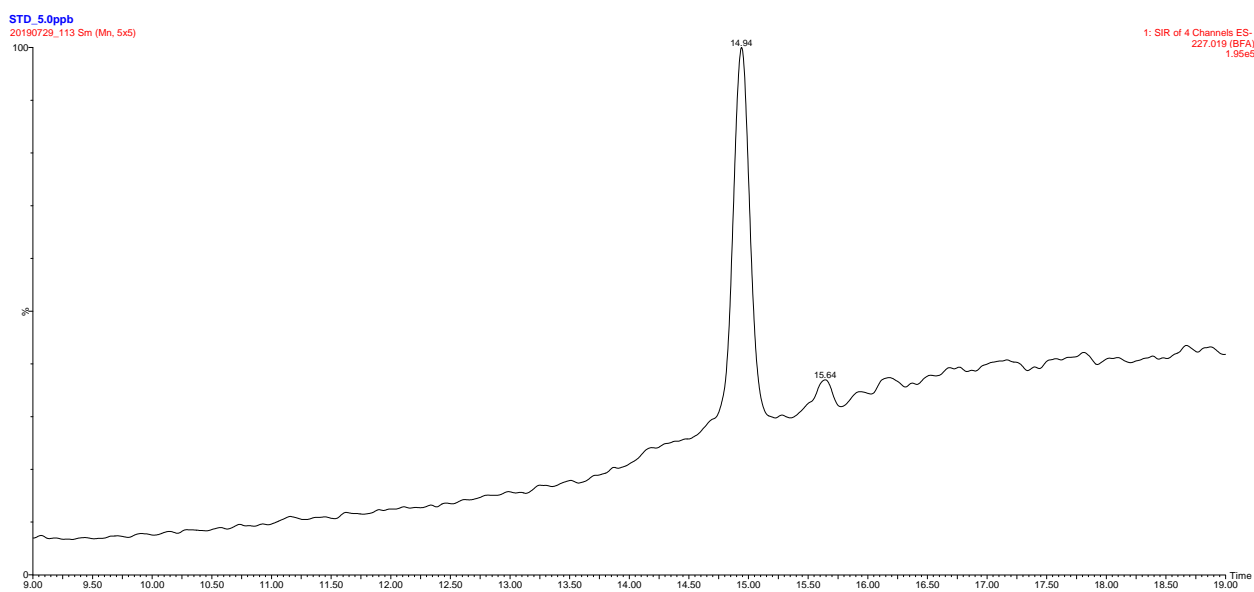
主なイオン (m/z)

対象化合物	m/z
ビスフェノール A	227

(クロマトグラム例)

ビスフェノール A

(濃度: 0.005 $\mu\text{g/mL}$)



OLC-MS/MS の測定条件例

- 装置: Waters UPLC-TQD
- カラム: Inertsil ODS4 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm
- カラム温度 40°C
- 移動相 水及びアセトニトリルの混液(7:3)から(0:10)までの濃度勾配 35 分間で行い、(0:10)で 10 分間保持する。
- 流量: 0.2 mL/min
- イオン化モード: ESI (-)
- キャピラリー電圧: 3000 V
- ソース温度: 150°C
- 脱溶媒温度: 400°C
- コーンガス流量: 50 L/hr
- 脱溶媒ガス流量: 700 L/hr
- コリジョンガス流量: 0.13 mL/min
- 注入量: 20 μL

主なイオン (m/z)

対象化合物	コーン電圧	プリカーサーイオン	コリジョンエネルギー	プロダクトイオン
ビスフェノール A	44	227	18	212
			26	133

(クロマトグラム例)

ビスフェノール A

(濃度: 0.005 $\mu\text{g/mL}$)

