

<別添>

令和2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

洗浄剤を対象とした改良メタノール分析法
共同実験プロトコル

令和2年9月1日

1. 共同実験の目的

本共同実験は、洗浄剤について、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)で定めるメタノールの規格適合性を判定する場合に用いる試験法として改良メタノール分析法の性能評価を行うことを目的とする。

2. スケジュール

試料の配付・・・・・・・・・・一財) 食品薬品安全センター⇒各試験所

↓
(9月中旬～下旬に配付)

各試験所で分析・・・・・・・・・・(試料配付後3ヶ月間)

↓

結果の報告・・・・・・・・・・各試験所⇒研究代表者⇒解析者

↓
(12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

↓

報告書の作成・・・・・・・・・・研究代表者・解析者

3. 分析に関する全般的な注意事項

1) 本計画書に指示された分析法からの変更は認められない。

2) 分析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。

3) 分析対象であるメタノールのコンタミネーションの予防に努め、得られる分析値に影響を及ぼさないように、これらの吸着や溶出を認めないと判断する分析器具を用いること。

4) 使用する器具によっては事前に校正されていることを確認しておくこと。

5) 分析は、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。

6) 分析の実施期間は試料受領後3ヶ月以内とする。突発的な他業務の遂行による遅延、機器の故障、特段の事情により分析の実施が遅延または分析が不可能となった場合は速やかに連絡すること。

【注意】分析の実施期間は試料受領後3ヶ月以内とするが、1ヶ月以内の分析を推奨する。

7) 分析結果は研究終了後、1年間保管すること。分析に関する測定データ等は令和4年3月末日まで保管すること。

8) 受領した試料は、分析までの間、本プロトコルに示された条件で保管すること。

4. 解析者

阿部 裕

【注意】 研究代表者及び解析者は、本研究で知り得た各試験所の情報・結果について守秘義務を負うものとする。

5. 参加試験所及び試験所コード

① 参加試験所

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、静岡県環境保健研究所、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】 共同実験を実施しない試験所も含む。

② 試験所コード

共同実験を実施する試験所には試験所コードを交付する。

試験所名と試験所コードの対応は非公開とする。

結果シートは、各試験所の担当者から研究代表者を経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。

6. 試料の調製及び配付

試料の調製及び配付は(一財)食品薬品安全センターが行う。

7. 試料の均質性及び安定性の確認

① 均質性の確認

国立医薬品食品衛生研究所にて各試料 10 点を受領直後に分析し、その分析値を解析して確認する。

② 安定性の確認

溶出試験の試料については、国立医薬品食品衛生研究所にて、各試料 10 点について①の

分析値と、その1ヶ月後(及び3ヶ月後)の分析値を解析して確認する。

8. 試料の配付及び保管

①試料配付時期の連絡

試料の配付予定時期は約1ヶ月前に、発送日はその1週間前に参加試験所に連絡する。各試験所は試料保管場所の確保、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配付する試料

分析試料：4 試料(試料 1～4)

ブランク試料：2 試料(ブランク試料 1～2)

③試料の確認

受領後はただちに試料数、溶媒・試料 No の判別、試料の状態を確認し、問題があれば至急連絡すること。

④試料の保管及び管理

試料は冷蔵で保管する。

【注意】 試料は冷蔵で送付する。

⑤試料の不足

何らかの事情により試料が不足して予定する分析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。

9. 分析手順

①試薬・試液等

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号 以下、告示) 第2 添加物の部 C試薬・試液等の項及び第3 器具及び容器包装の部 C試薬・試液等の項に示すものを用いる。

- ・水：市販の分析用精製水を含め、分析対象化合物から得られる分析値に影響を及ぼす濃度の含有を認めないもの。
- ・メタノール：特級。純度 $\geq 99.8\%$ を含むもの。
- ・2-プロパノール：特級。純度 $\geq 99.7\%$ を含むもの。メタノール分析を行うとき、分析値に影響を及ぼす物質を含まないことを確認する。
- ・メタノール標準原液：メタノール 1.00 g を量りとり、水で 1 L に定容する。(メタノール濃度：1000 $\mu\text{g/mL}$)
- ・2-プロパノール標準原液：2-プロパノール1.00 g を量りとり、水で1 Lとする。(2-プロパノール濃度：1000 $\mu\text{g/mL}$)
- ・内部標準溶液：2-プロパノール標準原液を10 mL量りとり、水で20 mLに定容する。(2-プロ

パノール濃度:500 µg/mL)

【注意】分析対象化合物から得られる分析値に影響を及ぼす不純物等の含有を認めない試薬の使用も可とする。

【注意】分析環境に応じて異なる濃度の標準原液の使用や指示された調製法と同一割合での調製容量の変更も可とする。

②装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器(GC-FID)
- ・10 mL 容ガラスバイアル：セプタムキャップで密封できるもの
- ・10 mL 容ガラスバイアル用セプタム：PTFE/シリコーンラバーセプタム

③試料測定溶液の調製

試料 1 g に内部標準溶液 1 mL を加え、水で 20 mL に定容する。

(試料 1~4→試料測定溶液 1~4)

また、ブランク試料 1 g に内部標準溶液 1 mL を加え、水で 20 mL に定容する。

(→ブランク試料測定溶液 1 及びブランク測定溶液 2)

④検量線用測定溶液の調製

1000 µg/mL メタノール標準原液を各 0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL 量りとり、内部標準溶液 1 mL を加え、水で 20 mL に定容する(濃度は 5 µg/mL、10 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL、75 µg/mL、100 µg/mL)。また、0 µg/mL 検量線用測定溶液として内部標準溶液 1 mL を水で 20 mL に定容した溶液を用いる。

【注意】分析環境に応じて指示された調製法と同一割合での調製容量の変更も可とする。

⑤分析操作

測定溶液 5 mL を各 10 mL ヘッドスペース用バイアルに量りとり、密封後、60°C に保ちながら 30 分間加熱する。加熱後、気相 1 mL をガスクロマトグラフに注入する。

【注意】気相の注入は、オートサンプラー又は手打ちにより行う。また、装置によっては 1 mL を注入できない場合があるが、その場合は試験を通じて一定量注入することでも良い。ただし、結果報告シートにその旨記載すること。

⑥測定条件

以下に示す以外の測定条件は使用する機器や分析環境に合わせて最適化する。

カラム： 内径 0.32 mm，長さ 60 m のケイ酸ガラス製細管に，6%シアノプロピルフェニル- 94%ジメチルポリシロキサンを 1.8 µm の厚さでコーティングしたもの

のを用いる。

カラム温度：70℃（7分保持）-15℃/分-220℃（5分保持）

注入口温度：220℃

注入方法：スプリット（スプリット比 50:1）

キャリアーガス：He または N₂

流速：2 mL/min

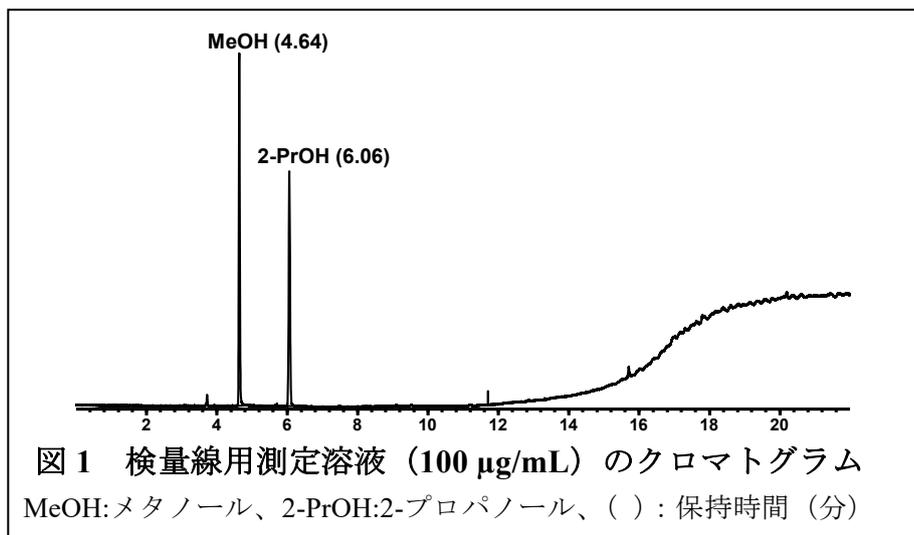
検出器温度：220℃

分析時間：22 min

【注意】カラム例として、DB-624 などが挙げられる。なお本条件で測定して得られたクロマトグラムを図1に示す。

【注意】キャリアーガスとして窒素の使用も可とする。その場合は、流速、測定時間等を使用する機器や分析環境に合わせて最適化する。

【注意】使用するカラムは国立衛研より送付するので、購入する必要はない。送付時期は配布試料よりも早い、もしくは同時期を予定している。



⑦検量線用測定溶液及び試料測定溶液の分析

検量線用測定溶液及び試料測定溶液の分析順は各浸出用液の組成ごとに以下に示すとおりとする。

1. 検量線用測定溶液(0 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、75 μg/mL、100 μg/mL)
2. ブランク試料測定溶液(2点)
3. 試料測定溶液(4点)
4. 検量線用測定溶液(50 μg/mL)

⑧定量

検量線用測定溶液の2-プロパノールに対するメタノールの信号強度比と濃度との一次回

帰式を求め、メタノールの検量線を作成する。作成した検量線に試料測定溶液の2-プロパノールに対するメタノールの信号強度比を内挿し、分析値(定量値)を算出する。

⑨選択性の確認

定量に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。

【注意】 ブランク試料測定溶液を分析することにより確認することもできる。

10. 結果の報告

- 1) 分析値、選択性の確認結果及びその他コメント等は、別添の報告様式(結果報告シート1～4: Excel ファイル)に入力する。なお、分析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、分析に関するコメント等

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…測定溶液の生データ(分析値算出に用いた面積又は高さ)

- 2) 各試料の分析値は試料中の濃度($\mu\text{g/g}$)とし、数値は有効数字3桁(4桁目を四捨五入)で報告する。

【注意】 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4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 $\mu\text{g/L}$ 単位で検量線を作成するとよい。

- 3) 試料の濃度が検量線の濃度範囲よりも低い場合は、濃縮して測定する必要はない。この場合の分析値は「<100」のように記載して報告する。

- 4) 結果入力後の報告様式の電子ファイルは下記の全e-mail アドレスまで提出する。また、全電子ファイルの印刷物1部を研究代表者まで提出する。

なお、試料に異常があった場合、分析に関する事前紹介先も以下の提出先に同じである。

報告期限：令和2年12月4日(金)

以上

R2「改良メタノール分析法」結果報告シート1

(試料・機器・試薬の情報)

1. 試験コード

機関コード *1

2. 使用した機器

機器 *2	メーカー	型式	開示の可否 *3	
GC	アジレント	7890A	可	
HS	アジレント	7697A		

3. 使用した試薬

試薬 *4	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
メタノール	和光	LCMS用	99.8
2-プロパノール	和光	HPLC用	
水	オルガノ	ピュアリックωで調製した超純水	

4. 試料の保管

試料の保管方法 *5	冷蔵庫で保管し、使用時は室温で3時間放置後に使用。
------------	---------------------------

5. 共同実験全体に対する感想・コメントなど

*1 コードのみを記入、試験所名は記入しない

*2 測定に使用した機種すべてを記入。

*3 開示してもよいかどうか条件があれば記載

*4 他に使用した試薬があれば行を追加して記入

*5 分析時まで冷蔵庫等（10℃以下）で保存し、室温まで戻したのちに試験を実施する

R2「改良メタノール分析法」結果報告シート2

(測定条件)

1. 試験所コード

試験所コード *1

2. 測定条件*2*3

カラム名 (メーカー)	DB624 (アジレント)		
サイズ (長さ、内径、膜厚)	60 m, 0.32 mm, 1.8 μm		
カラム温度	70℃ (7分保持) -15℃/分-220℃ (5分保持)		
注入口温度	220℃		
注入方法 (スプリットなど)	スプリット		
スプリット比 (スプリットの場合)	50 : 1		
キャリアガス	流速 (mL/min)	He	2
ヘッドスペース (HS) 加熱温度*4	60		
HS加熱時間*4	30		
HSニードル温度*4*5	80		
HSTRansferライン温度*4*5	120		
注入量	1mL		

3. 検出条件

化合物	保持時間 (分)
メタノール	
2-プロパノール	

- *1 コードのみを記入、試験所名は記入しない
- *2 計画書と同じであっても確認のため記入する。
- *3 開示してもよい条件があれば記載
- *4 使用した場合でよい
- *5 分かる範囲で記入

R2「改良メタノール分析法」結果報告シート3

(定量結果)

1. 試験所コード、試料受領日、試料分析日

試験所コード *1	試料受領日	試料分析日

2. 分析結果

分析項目	濃度(μg/mL)*1					
	ブランク試料 1	ブランク試料 2	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
MeOH						

3. 検量線情報

一次回帰式		相関係数(R)*3	
-------	--	-----------	--

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、試験所名は記入しない

*2 濃度(μg/mL)を記入。有効数字3桁(4桁目を四捨五入)

*3 R2ではなくRで記入。3桁以上記入

R2「改良メタノール分析法」結果報告シート4

(測定データ)

1. 試験所コード

試験所コード *1

2. 測定情報

分析対象化合物	面積値が高さが選択→													
	面積値*2													
	0 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL	ブランク 試料1	ブランク 試料2	試料1	試料2	試料3	試料4	50 µg/mL (2回目)
メタノール														
2-プロパノール														

3. 測定情報 その2 *3

分析対象化合物	5 µg/mL の S/N
メタノール	

4. 試料およびメタノール採取量情報 *4

採取量 (g)	ブランク 試料1	ブランク 試料2	試料1	試料2	試料3	試料4	メタノール標準原液
試料 or メタノール	1.0052	1.0108	0.9972	0.9991	1.0259	0.9803	1.0013

←数値は例なので上書きする

*1 コードのみを記入、試験所名は記入しない

*2 面積値又は高さが得られない場合は「0」を記入する。

*3 厳密な数値を求める必要はない。ただし 5 µg/mLのS/Nが10未満であった場合は、S/N10以上となる濃度のS/Nを濃度とともに記載する。

*4 天秤を読み取った数値を最大5ケタまで記載する。「ブランク試料1」～「試料4」までは試料採取量、「メタノール標準原液」にはメタノール標準原液調製時のメタノール採取量を記入する。現在入力されている数値は例なので上書きすること。