

<別添>

令和3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

ポリカーボネートを主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装を対象とした材質試験の改良アミン類分析法
共同実験プロトコル

令和3年12月20日

1. 共同実験の目的と注意事項

・目的

本共同実験は、ポリカーボネートを主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装について、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第2：80号)で定めるアミン類(トリエチルアミン及びトリブチルアミンに限る。)の規格に適合していることの判定を目的として試験を実施する場合に、材質試験における改良アミン類分析法(定量分析法)の性能評価を目的とする。

・分析に関する全般的な注意事項

1) 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) 分析対象であるトリエチルアミン(TEA)およびトリブチルアミン(TBA)のコンタミネーション(主に、ガラス吸着を理由とするコンタミネーション)を予防するために、以下に示す手順で分析器具を洗浄した後に用いること。

【ガラス器具の洗浄手順】

2 vol%以上のギ酸槽を用意する(別添資料 1_図 1)。これに使用するガラス器具を一晩浸漬し、水ですすぎ乾燥させる(以下、ギ酸洗浄)。ギ酸槽を作成するのに用いるギ酸は1級のものでよい。

ギ酸洗浄するガラス器具の例を以下に示す。

三角フラスコ、ナスフラスコ、ホールピペット、メスフラスコ、保存瓶、
測定バイアル

なお、ガラス器具以外の材質の器具は一晩ギ酸槽に浸漬する必要はなく、ギ酸槽に数回潜らせたのち水ですすぎ乾燥させる。

3) 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。

・試料の保管に関する注意事項

受領した試料は、分析までの間それぞれの分析プロトコルに示された条件で保管すること。

・分析計画に関する注意事項

1) 「ポリカーボネートを主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装を対象とした材質試験の改良アミン類定量分析法(以下、定量分析法)」にしたがって実施する。

1日にブランク試料(2試料)及び添加試料(2濃度を各2試料で計4試料)を調製し、定量分析法にしたがって、ブランク試料及び添加試料の計6試料を併行分析し、この分析を5日間実施する。なお、分析の実施にあたり、1日に定量分析法による試料の併行分析を複数回行わないこと。

2) 分析1回につき試料を使用せずに同様の分析操作を行う空試験(操作ブランク分析)2点の併行分析を実施する。

- ・ 配付試料の内訳は、以下の通りである。
ポリカーボネート製ボトル：1本(約60 g)
- ・ 分析の実施期間に関する注意事項
分析の実施期間は試料受領後から報告期限までとする。
- ・ 分析結果の報告に関する注意事項
分析結果は、求められた分析に付随する情報とともに、配布された報告様式(エクセルファイル)に入力し、下記のe-mail アドレスまで提出する。
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。
提出先 (e-mail)：国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
六鹿元雄 (mitsuga@nihs.go.jp)
阿部裕 (y-abe@nihs.go.jp)
片岡洋平 (ykataoka@nihs.go.jp)

【報告様式の内容】

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…分析条件、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

(定量結果の算出に用いたピーク面積又はピーク高さ)

報告シート5…0.0025 µg/mL 検量線用標準溶液のクロマトグラム(1回分)

【報告様式の報告期限】 令和4年2月28日(月)

定量分析法プロトコル 液体クロマトグラフ-質量分析法(LC-MS法、LC-MS/MS法)

1. 試薬、試液*1

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、添加濃度の分析対象元素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。
- ・TEA塩酸塩 97%以上を含むもの。
- ・ギ酸：特級以上の試薬を用いる。
- ・ギ酸アンモニウム：特級以上の試薬を用いる。又は、高速液体クロマトグラフィー用 1mol/L ギ酸アンモニウム溶液を用いる。
- ・2 vol%ギ酸：ギ酸20 mLを量りとり、水で1000 mLとする。
- ・2 vol%ギ酸・アセトニトリル：ギ酸20 mLを量りとり、アセトニトリルで1000 mLとする。
- ・2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)：2 vol%ギ酸500 mLと2 vol%ギ酸・アセトニトリル 500 mLを混合する。
- ・1000 µg/mL TEA標準原液：TEA塩酸塩を68.0 mgを量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで50 mLに定容する。又は、TEA 50 mgを量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで50 mLに定容する。
- ・1000 µg/mL TBA標準原液：TBA 50 mgを量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで50 mLに定容する。
- ・50 µg/mL混合標準溶液：1000 µg/mL TEA標準原液及び1000 µg/mL TBA標準原液を各1 mL量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで20 mLに定容する。
- ・12.5 µg/mL混合標準溶液：50 µg/mL 混合標準溶液を5 mL量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで20 mLに定容する。
- ・添加用標準溶液A：12.5 µg/mL混合標準溶液を4 mL量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで50 mLに定容する。(TEA及びTBA濃度：1 µg/mL)
- ・添加用標準溶液B：添加用標準溶液Aを5 mL量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリルで25 mLに定容する。(TEA及びTBA濃度：0.2 µg/mL)
- ・0.125 µg/mL標準溶液：12.5 µg/mL混合標準溶液を1 mL量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)で100 mLに定容する。(TEA及びTBA濃度：0.125 µg/mL)
- ・12.5 mMギ酸アンモニウム・0.1 vol%ギ酸：ギ酸アンモニウム0.788 g (1mol/L ギ酸アンモニウム溶液の場合は12.5 mL)およびギ酸1 mLを量りとり、水で1000 mLに定容する。
- ・0.1 vol%ギ酸アセトニトリル：ギ酸1 mLを量りとり、アセトニトリルで1000 mLに定容する。

注意事項

- *1 1) 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を使用してもよい。なお、分析に用いる試薬は、新たに開封後の試薬をアミン類分析専用として他の分析に用いる試薬とは区別して用いること(コンタミネーション予防のためであり、特に、ギ酸、アセトニトリル、1mol/L ギ酸アンモニウム溶液は必ずアミン

類分析専用とすること)。

- 2) 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を変更してもよい。

2. 器具*2

ホールピペット：容量が1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、10 mL、20 mLのものを用いる。
マイクロピペット：量りとることができる最大容量が0.2 mL、1 mL及び5 mLのものを用いる。

メスフラスコ：容量が20 mL、25mL、50 mL、100 mL、1000 mLのものを用いる。

200 mL三角フラスコ

300 mLナスフラスコ

メスシリンダー

攪拌子(回転子)

注意事項

- *2
- 1) フッ素樹脂製の器具がある場合は、それらを用いる方が吸着の懸念が少ない。
 - 2) TEA 及び TBA は光曝露により徐々に分解する可能性があるため、ガラスの保存瓶を用いる場合は褐色の器具や保存瓶を使用するのが望ましい。なお、フッ素樹脂製保存瓶(例、サンプルテック社製、カタログ No. : 18100、容量 : 100 mL : [別添資料 1_図 2](#))を用いることもできる。この場合の標準溶液の保存については、保存瓶にアルミ箔を巻いておくもよい。

3. 機器

- ・スターラー
- ・減圧濃縮器(エバポレーター)
- ・液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS又はLC-MS/MS)

4. 試料

- ・受領した試料は分析までの間は室温で保存し、5 mm角以下に細切して分析に用いること。

5. 分析

5-1. 測定溶液の調製*3

- 1) ブランク試料の場合

試料1.0 gを200 mL三角フラスコに入れ、2 vol%ギ酸・アセトニトリル1 mL及びジクロロメタン10 mLを加えて試料を溶解させる。水を1 mL加えた後、攪拌子でよくかき混ぜながらアセトン120 mLを滴加し不純物を析出させる。毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上清を300 mLナスフラスコにとる。沈殿にアセトン30 mLを加えて洗浄後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上清を先の300 mLナスフラスコにとる。40℃の水浴で加温しつつ、エバポレーターにより1 mL以下まで溶媒を留去する。これを2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)で50 mLに定容する。その1 mLを採り、孔径0.5 µm以下のメンブランフィルターでろ過した溶液を測定溶液とする。また、同時に試料を使用しないで、試料と同様の分析操作を行う空試験(操作ブランク分析)も2併行で

実施する。

→ブランク測定溶液1及びブランク測定溶液2

→操作ブランク測定溶液1及び操作ブランク測定溶液2

2) 添加試料の場合

試料1.0 gを200 mL三角フラスコに入れ、添加溶液A又は添加溶液Bを1 mL及びジクロロメタン10 mLを加えて試料を溶解させる。水を1 mL加えた後、攪拌子でよくかき混ぜながらアセトン120 mLを滴加し不純物を析出させる。毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上清を300 mLナスフラスコにとる。沈殿にアセトン30 mLを加えて洗浄後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上清を先の300 mLナスフラスコにとる。40℃の水浴で加温しつつ、エバポレーターにより1 mL以下まで溶媒を留去する。これを2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)で50 mLに定容する。その1 mLを採り、孔径0.5 µm以下のメンブランフィルターでろ過した溶液を測定溶液とする。

→添加測定溶液A-1及び添加測定溶液A-2

→添加測定溶液B-1及び添加測定溶液B-2

注意事項

*3 1) 三角フラスコを使用する代わりに、フッ素樹脂製遠心瓶(例、ThermoFisher Scientific社製、カタログ No. : 3127-0250PK、容量 : 250 mL : [別添資料 1_図 3](#))を用いることもできる。

2) 遠心する代わりにろ過することもできる。その場合は、綿栓ろ過でよいが、ガラス漏斗はギ酸洗浄すること([別添資料 1_図 4](#))。この場合の分析概要を[別添資料 2](#)に示す。

3) 遠心分離又は綿栓ろ過後の溶液に析出後の不純物が混じったとしても、その後の操作や分析値に影響ないことを確認している。

4) 測定バイアルはガラス製バイアルの場合、ギ酸洗浄後のもの又は低吸着バイアル(島津ジーエルシー社製 TORAST-H Glass Vial、カタログ No. : 370-04300-03 又は 370-04300-04、容量 : 1.5 mL)を用いること。

(<https://solutions.shimadzu.co.jp/cgi/ac?cmd=1&url=/glc/shopping/vials/level2/f21.html>)

ポリプロピレン製バイアルを用いる場合、LC-MS での測定の際に TBA のピークの近傍に非特異ピークが確認される(各社のポリプロピレン製バイアルで確認している)ので注意する(別添資料 1_図 5)。なお、LC-MS/MS での測定時にはこのピークによる定量への影響はないことを確認している。

5-2. 検量線用測定溶液の調製

0.125 µg/mL 標準溶液を 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、10 mL、20 mL ずつ量りとり、2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)で 50 mL に定容した溶液を調製する(各溶液の TEA 及び TBA 濃度は 0.0025 µg/mL、0.005 µg/mL、0.0075 µg/mL、0.01 µg/mL、0.025 µg/mL、0.05 µg/mL)。また、0 µg/mL 検量線用測定溶液として 2 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)を用いる。

5-3. 測定条件*4

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： スルホベタイン基化学結合型シリカゲルカラム(HILIC カラム)
(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm)を用いる。

カラム温度 40°C

移動相： A：12.5 mM ギ酸アンモニウム・0.1 vol%ギ酸

B：0.1 vol%ギ酸アセトニトリル

A/B：40/60 (0-10 min)- 100/0 (10-15 min)- 40/60 (15-25 min)

流速：0.2 mL/min

注入量：2 μL

イオン化法：ESI(+)

定量イオンおよび定性イオン (m/z)：

	TEA	TBA
MS 条件	102	186
MS/MS 条件	102→74(定量イオン) 102→58(定性イオン)	186→130(定量イオン) 186→57(定性イオン)

注意事項

- *4
- 1) 使用するカラムとして ZIC-HILIC(メルク社製)が挙げられる。
 - 2) 機器の性能に応じて、移動相条件のうちカラム洗浄時間およびカラム平衡化時間を変更してもよい。
 - 3) TEA はオートサンプラーのニードル等に残留しやすいためキャリーオーバーに注意する。ニードルの洗浄液として 0.1 vol%ギ酸・50 vol%メタノールでキャリーオーバーがほぼ解消されることを確認している(洗浄液中のメタノール含量を 50 vol%以上にする)。
 - 4) 分析環境に応じて測定に注入量を変更することも可とするが、注入量を増やすと TBA の分析値が低くなる場合があることを確認している。

5-4. 検量線用測定溶液及び試料測定溶液の分析

標準溶液及び試料測定溶液の分析順は以下に示すとおりとする*5。

- 1、検量線用測定溶液(0 μg/mL、0.0025 μg/mL、0.005 μg/mL、0.0075 μg/mL、0.01 μg/mL、0.025 μg/mL、0.05 μg/mL)
- 2、操作ブランク測定溶液 1 及び操作ブランク測定溶液 2
- 3、ブランク測定溶液 1 及びブランク測定溶液 2
- 4、添加測定溶液 A-1 及び添加測定溶液 A-2
- 5、添加測定溶液 B-1 及び添加測定溶液 B-2
- 6、検量線用測定溶液(0.025 μg/mL)

注意事項

- *5 分析環境に応じて測定に任意の工程(捨てうち、QC 溶液の測定、洗浄等)を適宜追加してもよい。

以上

R3「材質試験_アミン類」結果報告シート1

(検体・機器・試薬の情報)

1. 試験所名、御担当者名、分析項目

試験所名	御担当者名	
国立医薬品食品衛生研究所	御名前	〇〇〇〇
	email@.....

2. 使用した機器

機器 *1	メーカー	型式	開示の可否 *2	
HPLC	Waters	ACQUITY UPLC H-Class	可	
MS	Waters	Xevo-TQD cronos	可	

3. 使用した試薬等

試薬 *3*4	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
トリエチルアミン塩酸塩	シグマ-アルドリッチ		> 99.0%
トリプチルアミン	和光純薬	和光特級	98%
ギ酸	和光純薬	LCMS用	> 99%
アセトニトリル	関東化学	LC/LCMS用	99.9%
1mol/l 硝酸アンモニウム溶液	和光純薬	高速液体クロマトグラフ用	
超純水	ORGANO	ピュアリック-ω	比抵抗>18.2MΩ TOC<1ppb
メンブレンフィルター	Millex	PTFE LCR	LG 0.20μm
ジクロロメタン	関東化学	ダイオキシン類分析用(10万倍濃縮)	>99.5%(GC)
アセトン	シグマ-アルドリッチ		>99.5%
メタノール	関東化学	LCMS用	>99.8%(GC)

4. 使用した器具の材質

材質	器具名
ガラス	遠沈瓶以外の器具
PFA	遠沈瓶

5. 器具の洗浄方法

ガラス製器具は、10vol%のギ酸に一晚浸漬後、水でよく濯ぎ風乾後に使用した。PFA製器具は使用前に10vol%のギ酸で数回潜らせた後、水でよく濯ぎ風乾後に使用した。

6. 試料の保存

試料の保存方法	室温
---------	----

7. 試験全体に対する感想・コメントなど

- *1 測定に使用した機種すべてを記入。
- *2 開示してもよいかどうか条件があれば記載
- *3 他に使用した試薬があれば行を追加して記入
- *4 市販の混合標準液を使用した場合はまとめて記載

R3「材質試験_アミン類」結果報告シート2

(測定条件)

試験所名

国立医薬品食品衛生研究所

1. 分析条件、測定条件等*1*2

分析項目	トリブチルアミン・トリエチルアミン
減圧濃縮時の機器の圧力表示値	250 h Pa
1サンプルあたりの減圧時間(概算値)	15分
使用したバイアルの種類・使用法	サーモ製ガラスバイアルを2v/v%ギ酸に一晩浸漬後、水で洗浄してから使用
	HPLC条件
HPLCカラムの種類、サイズ	ZIC-HILIC (150 × 2.1 mm, 3.5 μm)
注入量	2 μL
流速	0.2 mL/min
移動相条件(A/B, 時間)	40/60 (0-10 min)- 100/0 (10-15 min)- 40/60 (15-25 min)
選択して下さい→	MS条件
イオン化モード	ESI(+)
キャピラリー電圧	1000V
コーン電圧	20V
ソース温度	150℃
脱溶媒温度	400℃
コーンガス流量	50L/hr
脱溶媒ガス流量	600L/hr

2. 検出条件

化合物	保持時間 (分)
トリブチルアミン	1.8
トリエチルアミン	2.6

*1 計画書と同じであっても確認のため記入する。

*2 必要に応じて追加する。

R3「材質試験_アミン類」 結果報告シート3

試験所名

1日目

測定

MS

1. 定量結果

測定試料		濃度(μg/g)*1	
		トリブチルアミン	トリエチルアミン
		<i>m/z</i> 186	<i>m/z</i> 102
操作ブランク 測定溶液	1		
	2		
ブランク 測定溶液	1		
	2		
添加測定溶液A	1		
	2		
添加測定溶液B	1		
	2		

2. 検量線情報

分析項目		一次回帰式	相関係数(R)* 2
トリブチルアミン	<i>m/z</i> 186		
トリエチルアミン	<i>m/z</i> 102		

3. 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 濃度(μg/g)を記入。有効数字3桁(4桁目を四捨五入)

*2 R2ではなくRで記入。3桁以上記入

R3「材質試験_アミン類」結果報告シート3

試験所名

1日目

測定

MS/MS

1. 定量結果

測定試料		濃度(μg/g)*1			
		トリブチルアミン		トリエチルアミン	
		m/z 130	m/z 57	m/z 74	m/z 58
操作blank 測定溶液	1				
	2				
blank 測定溶液	1				
	2				
添加測定溶液A	1				
	2				
添加測定溶液B	1				
	2				

2. 検量線情報

分析項目		一次回帰式	相関係数(R)*2
トリブチルアミン	m/z 130		
	m/z 57		
トリエチルアミン	m/z 74		
	m/z 58		

3. 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 濃度(μg/mL)を記入。有効数字3桁(4桁目を四捨五入)

*2 R2ではなくRで記入。3桁以上記入

R3「材質試験_アミン類」結果報告シート4

試験所名

1日目

測定

MS

1. 検量線情報*1

濃度点(μg/mL)	ピーク面積値	
	トリブチルアミン	トリエチルアミン
	m/z 186	m/z 102
0		
0.0025		
0.005		
0.0075		
0.01		
0.025		
0.05		
0.025(2回目)		

2. 測定結果*1

測定試料		ピーク面積値	
		トリブチルアミン	トリエチルアミン
		m/z 186	m/z 102
操作ブランク 測定溶液	1		
	2		
ブランク 測定溶液	1		
	2		
添加測定溶液A	1		
	2		
添加測定溶液B	1		
	2		

濃度点(μg/mL)	ピーク高さ	
	トリブチルアミン	トリエチルアミン
	m/z 186	m/z 102
0		
0.0025		
0.005		
0.0075		
0.01		
0.025		
0.05		
0.025(2回目)		

測定試料		ピーク高さ	
		トリブチルアミン	トリエチルアミン
		m/z 186	m/z 102
操作ブランク 測定溶液	1		
	2		
ブランク 測定溶液	1		
	2		
添加測定溶液A	1		
	2		
添加測定溶液B	1		
	2		

*1 面積値又は高さが得られない場合は「0」を記入する。

R3「材質試験_アミン類」 結果報告シート4

試験所名

1日目

測定

MS/MS

1. 検量線情報*1

濃度点(μg/mL)	ピーク面積値			
	トリブチルアミン		トリエチルアミン	
	m/z 130	m/z 57	m/z 74	m/z 58
0				
0.0025				
0.005				
0.0075				
0.01				
0.025				
0.05				
0.025(2回目)				

濃度点(μg/mL)	ピーク高さ			
	トリブチルアミン		トリエチルアミン	
	m/z 130	m/z 57	m/z 74	m/z 58
0				
0.0025				
0.005				
0.0075				
0.01				
0.025				
0.05				
0.025(2回目)				

2. 測定結果*1

測定試料		ピーク面積値			
		トリブチルアミン		トリエチルアミン	
		m/z 130	m/z 57	m/z 74	m/z 58
操作ブランク 測定溶液	1				
	2				
ブランク 測定溶液	1				
	2				
添加測定溶液A	1				
	2				
添加測定溶液B	1				
	2				

測定試料		ピーク高さ			
		トリブチルアミン		トリエチルアミン	
		m/z 130	m/z 57	m/z 74	m/z 58
操作ブランク 測定溶液	1				
	2				
ブランク 測定溶液	1				
	2				
添加測定溶液A	1				
	2				
添加測定溶液B	1				
	2				

*1 面積値又は高さが得られない場合は「0」を記入する。