

<その3> メタクリル酸メチル試験法への HPLC の適用

研究協力者 阿部 裕
研究協力者 山口 未来
研究協力者 片岡 洋平
研究代表者 六鹿 元雄

国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

ポリメタクリル酸メチル (PMMA) はメタクリル酸メチル (MMA) を原料モノマーとするポリマーで、メタクリル樹脂やアクリル樹脂とも呼ばれる。透明度が高い、光透過度がガラスよりも優れている、軽くて強靱、耐酸性・耐アルカリ性などの特徴を有しているため、建物や乗り物のガラスの代替、義歯床など幅広い分野で使用される。また、食品用器具・容器包装としては、しょう油差し、計量カップ、コーヒードリッパー、コップなどに使用される。

原料モノマーである MMA のヒト健康への影響については、製品評価技術基盤機構 (NITE) の有害性評価書¹⁾によると、ラットに MMA を吸入または経口投与すると速やかに吸収され体内に分布し、その後速やかに代謝され、メタクリル酸とメタノールに分解される。実験動物に対する MMA の急性毒性値 (LD50 または LC50) は、ラットの経口投与で 7900~9400 mg/kg、吸入ばく露で 7093 (4 時間) ~16800 (2 時間) ppm、ラット経皮 (閉塞貼付) で 7500 mg/kg を示す。また、げっ歯類およびウサギにばく露した場合、眼、皮膚および気道粘膜への刺激作用が観察されることから、皮膚感作性物質と判断される。また、職業ばく露による喘息例も報告される。一方、吸入ばく露による生殖発生毒性と遺伝毒性は確認されず、また、経口による反復投与ではラットに飲水で 2 年間投与した試験で MMA による影響は確認されていない。発がん性についても国際

がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) はグループ 3 (ヒトに対する発がん性については分類できない物質) に分類している。

PMMA の製造工程において未反応の MMA が残存することがあり、また、残存した MMA は 20%エタノール (EtOH) に溶出しやすいことが報告されている²⁾。そのため食品衛生法では、浸出用液として 20% EtOH を用いる溶出試験 (60°C 30 分間) が規定され、溶出量を 15 µg/mL 以下としている。

その試験法は、溶出試験で得られた試験溶液を、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FID) で測定することとされている。しかし、20% EtOH のように水を多く含む溶液を GC-FID に注入すると、注入精度が安定しない場合があり³⁾、また、GC-FID の一部の錆びを促進するなどの問題が生じる。

本研究では、上記の課題を解決するため、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた MMA の分析について検討し、その性能を評価した。

B. 研究方法

1. 試料

試料 1 (メタクリル酸樹脂製計量カップ、ネットで購入、熱分解 GC-MS 分析により得られたクロマトグラムから PMMA 製であることを確認) および試料 2 (PMMA 製シート、ポリオレフィン等衛生協議会より供与頂いたもの)。

2. 試薬等

1) 試薬

MMA：純度 >99.8%、安定剤 (6-*tert*-butyl-2,4-xyleneol) 入り、東京化成工業株式会社製

EtOH：残留農薬・PCB 試験用、富士フィルム和光純薬株式会社製

水：ピューリック Ω (オルガノ株式会社製) で製造した超純水。

アセトニトリル：LC-MS 用、関東化学株式会社製

2) 標準原液および標準溶液

MMA 標準原液 (EtOH)：MMA 0.3 g を採り、EtOH を加え 200 mL とした (1500 μg/mL)。

MMA 標準原液 (20% EtOH)：MMA 0.3 g を採り、20% EtOH を加え 200 mL とした (1500 μg/mL)。

MMA 標準溶液 (EtOH)：MMA 標準原液 (EtOH) 1 mL を採り、EtOH を加え 100 mL とした (15 μg/mL)。

MMA 標準溶液 (20% EtOH)：MMA 標準原液 (20%EtOH) 1 mL を採り、20% EtOH を加え 100 mL とした (15 μg/mL)。

3. 装置

HPLC (alliance e2695 Separation Module, 2489 UV/VIS Detector, Waters 社製)

4. HPLC 測定条件

カラム：Inertsil ODS-4、4.6×150 mm, 粒子径 5 μm (ジーエルサイエンス株式会社製)

A 液：水、B 液：アセトニトリル

グラジエント：B 液 25% → 10 分 → 60% → 0.1 分 → 100% (7 分)

流速：1.2 mL/min

注入量：25 μL

カラムオープン温度：35℃

測定波長：205 nm

C. 研究結果及び考察

1. MMA 分析条件の検討

HPLC の分析条件は、JIS T6501 (義歯床用アクリル系レジン中のメタクリル酸メチルモノマーの分析)⁴⁾ を参考に、カラムは ODS 系カラム、移動相はアセトニトリル (ACN)、検出波長は 205 nm とした。JIS T6501 ではカラム長 25 cm のカラムを用いて 66% ACN の isocratic 条件で分析するが、その場合 20% EtOH でも検出される不純物ピークが MMA のピークと重なった (図 1)。そのためこれらのピークが分離可能なグラジエント条件を用いることとし、分析時間を短縮するため 15 cm カラムを用いた。さらに注入量、流速等を最適化し、研究方法で示す測定条件を決定した。そのクロマトグラムを図 2 に示した。

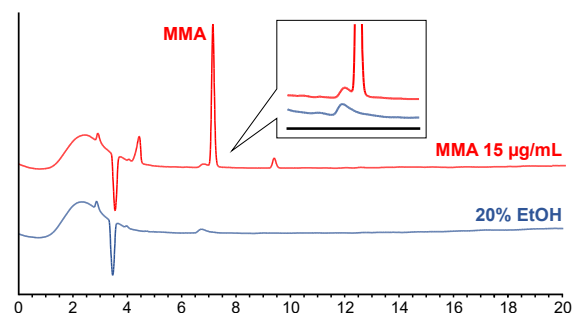


図 1 JIS T6501:2019 の分析条件による MMA 標準溶液 (15 μg/mL 20% EtOH 溶液) のクロマトグラム (205 nm)

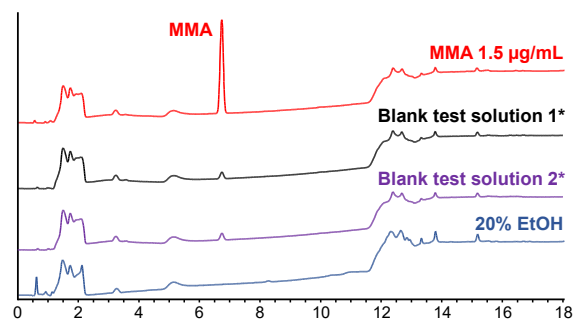


図 2 最適化した分析条件による MMA 標準溶液 (1.5 μg/mL EtOH 溶液) のクロマトグラム (205 nm)

*ブランク溶液 1、ブランク溶液 2

2. 標準溶液および試験溶液の調製

現行の規格試験法における MMA 標準溶液の調製方法は、“メタクリル酸メチル標準溶液 メタクリル酸メチル 1.5 g を採り、20%エタノールに溶かして 1000 mL とする。この液 1 mL を採り、20%エタノールを加えて 100 mL とする。”とされており、まず 1500 $\mu\text{g/mL}$ の 20%EtOH 溶液（標準原液）を調製した後、20%EtOH で 100 倍希釈して標準溶液を調製する。しかし、この方法で調製した MMA 標準溶液（20%EtOH）及び MMA 標準原液（20%EtOH）を経時的に測定したところ、ピーク面積の減少が観察され、MMA が加水分解している可能性が考えられた。溶出試験の浸出用液も同様の 20% EtOH であるため、試料からの MMA 溶出量を正確に測定するには、得られた試験溶液をできるだけ簡易な処理によって、試験溶液中の MMA の分解を抑制する必要がある。そこで、試験溶液を調製後、速やかに EtOH で希釈することにより加水分解の抑制を図った。

MMA 標準溶液（20%EtOH）を EtOH で 10、20、50 および 100 倍にそれぞれ希釈し、経時的に HPLC で測定した。その結果、希釈しない場合は 8 時間で約 15%、一晚（約 16 時間）で約 30%面積値が減少したが、EtOH で 10 倍以上希釈すると MMA の面積値は一晚（約 16 時間）経過後もほとんど変わらず、加水分解を抑制できることを確認した（図 3）。また、MMA 標準溶液（20%EtOH）を 10 倍希釈した後の溶液（MMA 1.5 $\mu\text{g/mL}$ ）のシグナルノイズ比（S/N）は 500 以上であり、限度試験を実施する上で、ピーク強度も十分であった。

次いで、MMA 標準原液の安定性についても検証した。20% EtOH および EtOH で調製した MMA 標準原液を調製し、室温および冷蔵条件で保存した際の MMA の安定性を確認した。MMA 標準原液（20% EtOH）

および MMA 標準原液（EtOH）は測定の直前に EtOH で 100 倍希釈して 15 $\mu\text{g/mL}$ 溶液として測定した。

MMA 標準原液を調製直後（0 日）の MMA の面積値を 100 とし、1、2、3、7、10、14 及び 21 日後の MMA の面積値を比較した。その結果、室温で保存した MMA 標準原液（20% EtOH）から調製した場合、MMA の面積値は徐々に低下し、21 日で約 13%低下した。一方、冷蔵保存した MMA 標準原液（20% EtOH）から調製した場合、10 日以降でわずかに減少する傾向がみられた。MMA 標準原液（EtOH）の面積値は、室温保存および冷蔵保存のいずれの場合においても全期間を通して 0 日目の 97%以上であった（図 4）。

このように、MMA 標準原液（20% EtOH）は、冷蔵保存で 1 週間程度まで保管できるが、試験溶液を EtOH で希釈した後に測定することを考慮し、標準原液及び標準溶液は EtOH 溶液とすることとした。

以上の結果から、溶出試験によって得られた試験溶液を EtOH で 10 倍希釈して測定し、MMA 標準溶液は 20%EtOH 溶液から EtOH 溶液に変更することとした。

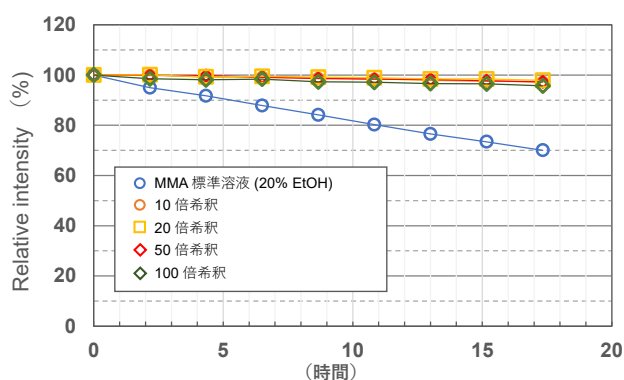


図 3 EtOH 希釈による室温放置下の MMA のピーク面積値の変化

最初に測定したときのピーク面積値を 100 とし、各経過時間における面積値を相対的に示した

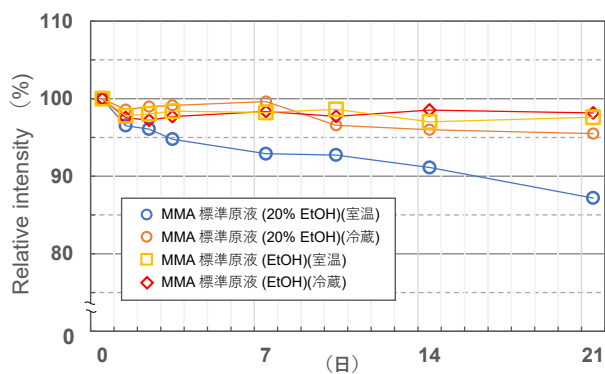


図3 標準原液の安定性

開始時に測定したときのピーク面積値を 100 とし、各経過時間における面積値を相対的に示した

4. 性能評価

1) 限度分析法

PMMA 製試料を用いて限度分析法としての性能を評価した。試料は溶出試験（浸出用液：20% EtOH、条件：60℃ 30 分間）を行い、MMA のピーク面積値が、MMA 1.5 $\mu\text{g/mL}$ における面積値の 1/10 以下（図 2）であった試料 1 および試料 2 を用いた。これらの試料を用いて溶出試験（浸出用液および条件：同上）を行い、得られた試験溶液をそれぞれのブランク溶液とした。また、MMA 標準原液（EtOH）200 μL にブランク溶液を加えて 20 mL としたものを添加溶液とした。各溶液は調製後すみやかに EtOH で 10 倍希釈した。

各溶液について 5 併行で希釈および測定を行った。また MMA 標準溶液（EtOH）は同じものを 5 回繰り返し測定した。

添加溶液のピーク面積値は、ブランク溶液のピーク面積値の平均値（ $n=5$ ）を差し引いた数値を用いた。標準溶液のピーク面積値（ SI_{standard} ）の平均値に対する添加溶液のピーク面積値（ SI_{sample} ）の平均値の比（ SI_{ratio} ）は、添加溶液 1 では 1.00、添加溶液 2 では 0.98 であった。また、 SI_{standard} の相対標準偏差（ S_{standard} ）は 2.4、 SI_{sample} の相対標準偏差（ S_{sample} ）は 3.1 および 1.9 であった（表 1）。いずれも「食品中の有害物質等に関する分

析法の妥当性確認ガイドラインについて」⁵⁾における限度分析の目標値（ $SI_{\text{ratio}} : 0.9-1.0$ 、 $S_{\text{standard}} : < 5$ 、 $S_{\text{sample}} : < 15$ ）を満たしていた。このように今回提案した分析法は告示に示された試験法と比べて検出されるピーク面積値が 1/10 となるが、規格試験法として適用可能な性能を有していることが判明した。

表 1 限度分析法における性能パラメーター

Trial	Peak area		
	SI_{standard}	$SI_{\text{sample 1}}^*$	$SI_{\text{sample 2}}^*$
1	2603	2599	2537
2	2567	2563	2510
3	2525	2502	2448
4	2511	2574	2425
5	2446	2401	2445
AVE	2530	2528	2473
SI_{ratio}	-	1.00	0.98
S_{standard} and S_{sample}	2.4	3.1	1.9

*Peak area: The blank value (average of five trials of blank solutions) was subtracted from each analyzed value.

SI_{standard} : peak area of the MMA standard solution (1.5 $\mu\text{g/mL}$, EtOH)

SI_{sample} : peak area of analytical solution

SI_{ratio} : ratio of SI_{sample} average to SI_{standard} average

S_{standard} : relative standard deviation of SI_{standard} ($n = 5$)

S_{sample} : relative standard deviation of SI_{sample} ($n = 5$)

2) 定量分析法

次いで、定量分析法としての性能を評価した。検量線範囲は規格値相当濃度（1.5 $\mu\text{g/mL}$ ）の 1/5~2 倍の範囲、すなわち 0.3~3 $\mu\text{g/mL}$ の範囲とした。なお、この範囲における検量線の決定係数（ r^2 ）は 0.999 以上と良好な直線性が得られた。また、0.3 $\mu\text{g/mL}$ における S/N は 50 以上であり、十分なシグナル強度であった。以上のことから検量線範囲として問題はないと考えられた。

1) 限度分析法と同様に調製した添加溶液およびブランク溶液について、それぞれ試験者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間分析した。得られた MMA の濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）から真度（%）および一元配置の分散分析により併行精度

(RSD_r%) および室内精度 (RSD_R%) を求めた (表 2)。ただし添加溶液の濃度はブランク溶液の濃度を差し引いた値を用いた。それぞれの添加溶液における真度は 98.5 および 100.5%、RSD_r は 1.2 および 0.6%、RSD_R は 1.9 および 1.0% であった。真度は CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL (27th edition)⁶⁾ が定めるサンプル濃度 10 mg/kg (10 µg/mL に相当) における目標値 (80–110%)、精度は Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis (CAC/GL 40)⁷⁾ が設定するサンプル濃度 1 mg/kg (1 µg/mL に相当) 以上における室内性能評価の目標値 (repeatability: 10%, within laboratory reproducibility: 16%) を満たしていたことから、本法の性能が妥当であると判断した。

D. 結論

HPLC を用いた MMA 分析法を検討し、その妥当性を確認した。

HPLC 条件は JIS の方法を参考にし、より分析時間の短い条件とした。また、MMA は 20% EtOH 溶液中で不安定であることが判明したため、試験溶液を調製後速やかに EtOH で 10 倍以上希釈することとし、MMA 標準溶液は 20%EtOH 溶液から EtOH 溶液に変更した。本法は限度分析法及び定量分析法のいずれにおいても規格試験として適用可能な性能を有していることが判明したことから、規格基準に示された GC-FID を使う試験法の代替分析法として使用可能であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 有害性評価書 Ver. 1.0 No.93 メタクリル酸メチル, https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/hazard/hyokasyo/No-93.pdf (最終アクセス日: 令和 4 年 3 月 29 日)
- 2) Ohno, H., Mutsuga, M., Kawamura Y.: Identification and Quantitation of Volatile Organic Compounds in Poly(methyl methacrylate) Kitchen Utensils by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Journal of AOAC INTERNATIONAL, 97, 1452-1458 (2014).
- 3) 阿部 裕、山口未来、大野浩之、阿部智之、六鹿元雄、佐藤恭子: ナイロン製食品用器具・容器包装のカプロラクタム試験におけるピーク形状改善のための GC 測定条件の検討、日本食品化学学会誌、27, 178-183 (2020).
- 4) 日本産業規格、義歯床用レジン、T6501:2019
- 5) 食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて、食安発 1222 第 8 号 平成 26 年 12 月 22 日
- 6) Codex Alimentarius Commission Procedural Manual (27th edition) (ISSN 1020-8070), Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2019).
- 7) Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis, CAC/GL 40-1993

表 2 定量分析法における性能パラメーター

Sample	Trial	Concentration (µg/mL)*					Mean (µg/mL)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5				
1	1	14.7	14.8	14.4	15.1	14.3	14.8	98.5	1.2	1.9
	2	15.0	15.1	14.7	15.0	14.6				
2	1	15.1	15.1	14.8	15.2	14.9	15.1	100.5	0.6	1.0
	2	15.1	15.2	15.0	15.3	15.0				

*Concentration: The blank value (average of five trials of blank solutions) was subtracted from each quantified value of test solutions.