

令和 6 年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

分担研究課題

市販製品に残存する化学物質に関する研究

ホルムアルデヒド試験法
ビスフェノール A 試験法
共同実験プロトコル

令和 6 年 8 月 20 日

R6 共同試験 WG

WG メンバー

氏名	所属
阿部 智之	日本食品衛生協会
岩越 景子	東京都健康安全研究センター
海野 明広	愛知県衛生研究所
風間 貴充	日本食品分析センター
岸 映里	大阪健康安全基盤研究所
佐藤 環	福岡県保健環境研究所
藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
片岡 洋平	国立医薬品食品衛生研究所
藤原 恒司	国立医薬品食品衛生研究所
山口 未来	国立医薬品食品衛生研究所
六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所

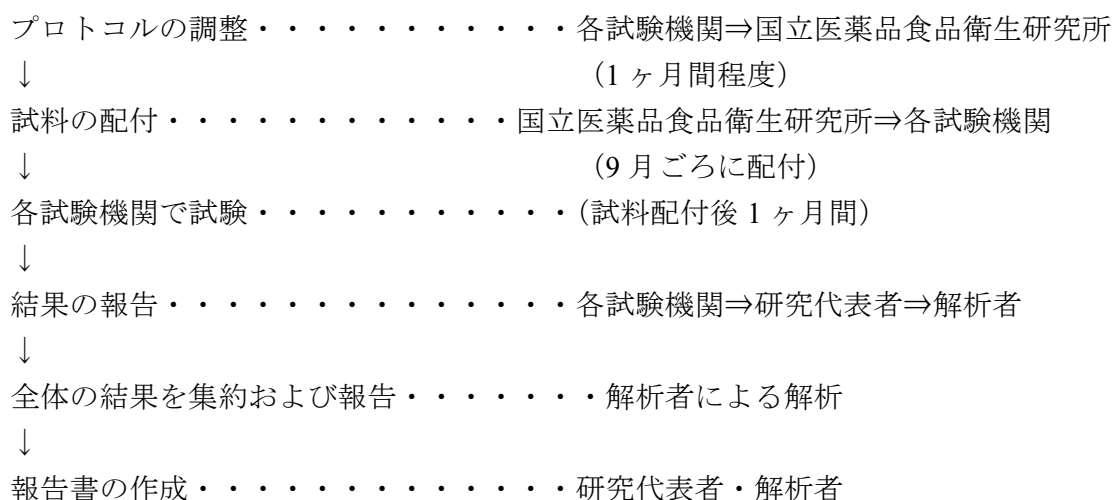
A 目的

食品衛生法における食品・添加物等の規格基準では、フェノール樹脂、メラミン樹脂、ユリア樹脂、それ以外のホルムアルデヒドを原料とする合成樹脂製の器具・容器包装、ゴム製の器具・容器包装、内面に合成樹脂が塗装された金属缶についてホルムアルデヒドの溶出試験が設定されている。また、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令においても、内面に合成樹脂を塗装した金属缶、密栓用の合成樹脂加工アルミニウム箔についてホルムアルデヒドの溶出試験が設定されている。平成 30 年度の厚生労働科学研究において、ホルムアルデヒド試験法の簡易化を目的とした検討がなされ、アセチルアセトン試液の反応条件については、60℃10 分間に簡易化することが可能であること、試験溶液の着色や濁り等の妨害物質の除去を目的とした水蒸気蒸留操作については、大部分の試験溶液では蒸留操作を必要としないこと、妨害物質の除去方法として活性炭を用いた方法を適用できる可能性が高いことが確認されている。また、適否判定は、試験溶液による呈色と水による呈色を目視で比較する官能試験であるため、結果には人為的裁量が入り個人差を伴う可能性がある。昭和 42 年 3 月 8 日環食化第 7006 号では、試験溶液の呈する色が水による対照液の呈する色とほとんど差がない場合の限界量は 4 ppm (4 µg/mL) に相当することが示されており、ほとんどの検査機関がこれら通知に基づき適合または不適合の判断を行っている。

令和 5 年 4 月、EFSA はビスフェノール A (BPA) の耐容一日摂取量 (TDI: Tolerable Daily Intake) を 0.2 ng/kg 体重/日と設定した。この評価結果に基づき、欧州連合では器具・容器包装への BPA の使用の禁止に向けた検討が進められている。日本における BPA の TDI は、0.05mg/kg 体重/日であり、BPA の溶出量は、フェノール、BPA および p-tert-ブチルフェノールの合計量として 2.5 µg/mL 以下とされているが、食品安全委員会から提示される新たな TDI によっては、現行の規格値を大幅に下げる必要が生じる。

そこで令和 6 年度は共同試験として、ホルムアルデヒド試験法について、水蒸気蒸留の操作を省略し、目視による呈色の確認を吸光度による定量法に変更した改良法について、共同試験を実施し、規格試験法としての妥当性を確認する。さらに、BPA について、各試験所における定量下限値を確認することにより、試験により管理することが可能な溶出量の下限値を探索する。

B スケジュール



C 試験の実施に関する注意事項

- 1) 各試験は、それぞれの試験法プロトコルにしたがって実施すること。指示された方法からの変更は認められない。
- 2) 試料は、試験開始までの間それぞれの試験法プロトコルに示された条件で保管すること。
- 3) 配布された試料等に異常があった場合、試験に関する事前照会は下記の連絡先に連絡すること。
- 4) 使用する器具類については、事前に校正されていることを確認しておくこと。
- 5) 特段の理由がない限り、試験の実施は1試料につき1回のみとする。
- 6) 試験の実施期間は試料受領後から報告期限までとする。
- 7) 試験結果は、求められた試験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）に入力して提出すること。

【報告様式の内容】

報告シート1…ホルムアルデヒド試験の機器、試薬等の情報、コメント等

報告シート2…ホルムアルデヒド試験結果、試験中のトラブル等

報告シート3…ビスフェノールA試験の機器、試薬等の情報、コメント等

報告シート4…ビスフェノールA試験結果、試験中のトラブル等

【報告様式の報告期限】令和6年10月末（試験は9月末までに実施すること）

D 解析者

ホルムアルデヒド試験：片岡洋平（国立医薬品食品衛生研究所）

ビスフェノールA試験：六鹿元雄（国立医薬品食品衛生研究所）

ホルムアルデヒド試験法プロトコル

1. 試薬、試液

次に示すものを用いる。

- ・水：食品用製造用水を超ろ過（逆浸透，限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製したもの。 ←各試験所で用意
- ・アセチルアセトン試薬*¹：酢酸アンモニウム 150 gを水に溶かし、酢酸 3 mL及びアセチルアセトン 2 mLを加え、更に水を加えて正確に 1,000mLとする。用時調製する。
- ・アセチルアセトン： $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ [K 8027, 特級] ←各試験所で用意
- ・酢酸アンモニウム： $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ [K 8359, 特級] ←各試験所で用意
- ・酢酸： CH_3COOH [K 8355, 特級] ←各試験所で用意
- ・活性炭*²：日本薬局方 薬用炭
- ・ホルムアルデヒド標準原液*^{1,3}：ホルムアルデヒド液 2.5 mLに水を加えて正確に1,000 mLとする。本液 1 mLはホルムアルデヒド 1 mgを含む。
- ・ホルムアルデヒド液：[K 8872, 特級] 36.0～38.0% ←各試験所で用意

*¹：試験環境に応じて指示された調製法と同一の割合であれば、調製容量を変更してもよい。

*²：通常の業務で使用しているものを用いる。ただし、所持していない場合は、試料と一緒に配布したものを用いてもよい。

*³：市販の標準液（1 mg/mL）を希釈して調製してもよい。

2. 器具および機器

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を用いる。ただし、長期間使用していない場合は、事前に洗浄等を行う。

3. 配布試料等

試料*：12 種（5 mL 程度）

ブランク試料*：1 種（50 mL 程度）

活性炭：1 g 程度

*：冷蔵庫内で保管し、室温まで戻したのちに試験操作を行う。

4. 試験操作

①試料 1～6（活性炭処理なし）

- (1) ホルムアルデヒド標準原液を水で希釈し、0、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 $\mu\text{g/mL}$ の検量線溶液を調製する。検量線溶液の「0」は、希釈時に使用した水とする。
- (2) 各試料を水で 10 倍希釈し（例：1 mL→10 mL）、試験溶液とする。（ブランク試料は希釈しない）
- (3) 試験溶液、ブランク試料および検量線溶液 5 mL を正確に量り、アセチルアセトン試液 5 mL を正確に加えて混和し、60°Cの水浴中で 10 分間加温する。これらを測定溶液とする。
- (4) 冷後、ブランク試料から調製した測定溶液を用いて分光光度計のゼロ点補正（ベースライン補正）を行う。

(5) 波長 415 nm で測定溶液の吸光度を測定する。

②試料 7～12（活性炭処理あり）

- (1) ホルムアルデヒド標準原液を水で希釈し、0、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 $\mu\text{g/mL}$ の検量線溶液を調製する。検量線溶液の「0」は、希釈時に使用した水とする。
- (2) 各試料を水で 10 倍希釈し（例：2 mL→20 mL）、試験溶液とする。（ブランク試料は希釈しない）
- (3) 活性炭約 0.05 g を容器に量り採り、ブランク試料および試験溶液 10 mL を加えて 30 分間放置した後、フィルターろ過（0.45 μm 程度）する。ろ液および検量線溶液 5 mL を正確に量り、アセチルアセトン試液 5 mL を正確に加えて混和し、60°Cの水浴中で 10 分間加温する。これらを測定溶液とする。
- (4) 冷後、ブランク試料から調製した測定溶液を用いて分光光度計のゼロ点補正（ベースライン補正）を行う。
- (5) 波長 415 nm で測定溶液の吸光度を測定する。

5. 留意事項等

- 現行法では水蒸気蒸留を行うため、試験溶液を20倍希釈している。そのため、限界量として示されている4 ppm（4 $\mu\text{g/mL}$ ）は、測定溶液では0.2 $\mu\text{g/mL}$ に相当する。今回の方法では水蒸気蒸留を行わないため、検量線溶液の上限を5 $\mu\text{g/mL}$ としている。
- 分光光度計のセルの材質およびサイズ（容量および光路長）は任意とする。
- 検量線の作成、定量は解析者が行うため、結果は、得られた吸光度を報告すればよい。（吸光度がマイナスとなった場合であっても、その値を報告する。）
- ブランク試料は、殺菌・除菌処理されていないナチュラルミネラルウォーター（エビアン）である。微生物がホルムアルデヒドを分解するので、ブランク試料はホルムアルデヒドを含まない。ブランク試料でゼロ点補正を行うことで、「水」に含まれるホルムアルデヒドの量を推定できる。
- アセチルアセトン試液による発色は経時的に徐々に減衰するため、吸光度の測定は、測定溶液を調製後 2 時間以内に行う。
- 検量線溶液は活性炭処理を行う必要はない。そのため、①と②の測定溶液を連続して測定する場合は、検量線溶液の測定は 1 回のみでよい。
- 検量線の作成、定量値の算出は解析者が行うため、得られた吸光度の値のみを報告すればよい。
- 活性炭は静電気等により揮散しやすいので、先に容器に直接量り採り、その後、試験溶液を加える。
- 平成30年度の厚生労働科学研究では、活性炭を添加した後の放置時間は10分間であったが、除去しきれない場合があるため、30分間に変更している。
- 平成30年度の厚生労働科学研究では、ろ紙ろ過で活性炭を除去していたが、ろ紙からの溶出物による影響を考慮してフィルターろ過に変更した。フィルターは不溶物の除去を目的とした一般的なものを用いる。

6. 結果の考察

- ・ 検量線溶液の吸光度から、各試験所の検量線と定量下限を検証
- ・ 濃度「0」の吸光度から、各試験所の「水」に含まれるホルムアルデヒド量を検証
- ・ 試料の吸光度から、本法の真度および精度を検証

ビスフェノールA試験法プロトコル

1. 試薬、試液

次に示すものを用いる。下記以外の試薬等を用いる場合は、試験結果に影響を与えないものを用いる。

- ・水：食品用製造用水を超ろ過（逆浸透，限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製したもの。
- ・アセトニトリル：CH₃CN [K 8032，特級]*

*：指定された規格より上位の規格のものを用いてもよい。

2. 器具および機器

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を用いる。ただし、長期間使用していない場合は、事前に洗浄等を行う。

3. 配布試料

BPA 溶液（100 µg/mL アセトニトリル溶液）約 10 mL

*：冷蔵庫内で保管し、室温まで戻したのちに試験操作を行う。

4. 試験操作

試料を50%アセトニトリルで0.001 ng/mL～2 µg/mLに希釈し、以下の条件で測定し、BPAのピーク面積を求める。ただし、記載のない条件は任意とする。

LC-UV（またはLC-PDA）、LC-FLD 測定条件

カラム ODS（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 µm）

カラム温度 40°C

移動相 A：水、B：アセトニトリル

A/B：70/30→(35 min, グラジエント)→0/100→70/30 (10 min, 保持)

流速 1 mL/min

注入量 20 µL

測定波長：(UV または PDA) 217 nm、(FLD) 励起 230 nm、蛍光 316 nm

LC-MS, LC-MS/MS 測定条件（参考）

カラム ODS（サイズ等は任意）

移動相 A：水、B：アセトニトリル

注入量 10 µL

イオン化法 ESI (-)

定量イオン (MS) m/z 227、(MS/MS) m/z 227→212 または 227→133

5. 留意事項等

- 1 機関当たり最大 3 検出器までとする。（MSおよびMS/MSを優先して選定する）
- 記載のない条件は任意であるが、ピーク形状が良好となるよう適切に設定した測定条件を

用いる。LC-MSおよびLC-MS/MSにおける諸条件は、装置、感度、ピーク形状等により、最適な条件に変更可能とする。ただし、LC-MSは選択イオンモニタリング（SIM）、LC-MS/MSは選択反応モニタリング（SRM or MRM）により測定する。

- BPA検出後の測定や洗浄は不要であるため、B液100%で10分間保持する操作は省略している。
- LC-MSとLC-MS/MSの測定は、同じ装置を用いてもよい。ただし、測定は個別に行うこと。
- 濃度「0」は、50%アセトニトリルとする。
- 検出不能（ピーク面積が計測不能）であった濃度よりも低い濃度は測定を省略してもよい。また、装置の汚染が危惧される場合は、高い濃度の測定を省略してもよい。
- 報告するピーク面積は各濃度1回の測定結果でよいが、そのピーク面積が適切であること（BPAのピークを選択していること、ベースラインが適切であること）、再現性を有すること（同濃度の溶液を複数回測定したとき、それらのピーク面積が同程度であること）を確認すること。
- 解析に際し、クロマトグラムの提出を依頼することがある。また、LC-MSおよびLC-MS/MSによる試験については、具体的な測定条件を設定したうえで、追加の試験を依頼することがある。

6. 結果の考察

- ・ 各濃度のピーク面積から検量線を作成し、各測定法の定量範囲と定量下限を検証

R6「ホルムアルデヒド試験」 結果報告シート 1

1. 試験所名、担当者名

試験所名	担当者名	
	名前	
	e-mail	

2. 使用した機器

機器	メーカー	型式	開示の可否 *	
天秤				
水浴				
分光光度計				
ろ過フィルター				
セル	材質：	容量（mL）：	光路長（mm）：	

3. 使用した試薬等

試薬	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
水			
ホルムアルデヒド液			
アセチルアセトン			
酢酸			
酢酸アンモニウム			
活性炭			

4. 試験全体に対する感想・コメントなど

* 開示してもよいかどうか条件があれば記載

R6「ホルムアルデヒド試験」 結果報告シート2

試験所名

1. 検量線溶液の吸光度

1) 検量線（試料1～6）の吸光度

濃度	吸光度	濃度	吸光度	濃度	吸光度
0		0.02		1	
0.001		0.05		2	
0.002		0.1		5	
0.005		0.2			
0.01		0.5			

2) 検量線（試料7～12）の吸光度（試料1～12を連続で測定した場合は記入不要）

濃度	吸光度	濃度	吸光度	濃度	吸光度
0		0.02		1	
0.001		0.05		2	
0.002		0.1		5	
0.005		0.2			
0.01		0.5			

2. 試験溶液の吸光度

試験	試料	吸光度	試験	試料	吸光度
活性炭処理 なし	試料1		活性炭処理 あり	試料7	
	試料2			試料8	
	試料3			試料9	
	試料4			試料10	
	試料5			試料11	
	試料6			試料12	

3. その他

気になった点、試験中のトラブルなど

R6「ビスフェノールA試験」 結果報告シート3

1. 試験所名、担当者名

試験所名	担当者名	
	名前	
	e-mail	

2. 使用した機器

機器	メーカー	型式	開示の可否 *	
LC				
UV				
PDA				
FLD				
MS				
MS/MS				

3. 使用した試薬等

試薬	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
水			
アセトニトリル			

4. BPA測定条件 (LC/MS、LC/MS/MSのみ)

LC/MS	カラム : カラム温度 : 移動相 : 流速 : 注入量 : イオン化法 : キャピラリー電圧 : 定量イオン :
LC/MS/MS	カラム : カラム温度 : 移動相 : 流速 : 注入量 : イオン化法 : キャピラリー電圧 : コーン電圧 : 定量イオン :

5. 試験全体に対する感想・コメントなど

* 開示してもよいかどうか条件があれば記載

R6「ビスフェノールA試験」 結果報告シート 4

試験所名

1. 検量線溶液のピーク面積

検出器		検出器		検出器	
濃度	ピーク面積	濃度	ピーク面積	濃度	ピーク面積
0 ng/mL		0 ng/mL		0 ng/mL	
0.001 ng/mL		0.001 ng/mL		0.001 ng/mL	
0.002 ng/mL		0.002 ng/mL		0.002 ng/mL	
0.005 ng/mL		0.005 ng/mL		0.005 ng/mL	
0.01 ng/mL		0.01 ng/mL		0.01 ng/mL	
0.02 ng/mL		0.02 ng/mL		0.02 ng/mL	
0.05 ng/mL		0.05 ng/mL		0.05 ng/mL	
0.1 ng/mL		0.1 ng/mL		0.1 ng/mL	
0.2 ng/mL		0.2 ng/mL		0.2 ng/mL	
0.5 ng/mL		0.5 ng/mL		0.5 ng/mL	
1 ng/mL		1 ng/mL		1 ng/mL	
2 ng/mL		2 ng/mL		2 ng/mL	
5 ng/mL		5 ng/mL		5 ng/mL	
10 ng/mL		10 ng/mL		10 ng/mL	
20 ng/mL		20 ng/mL		20 ng/mL	
50 ng/mL		50 ng/mL		50 ng/mL	
100 ng/mL		100 ng/mL		100 ng/mL	
200 ng/mL		200 ng/mL		200 ng/mL	
500 ng/mL		500 ng/mL		500 ng/mL	
1000 ng/mL		1000 ng/mL		1000 ng/mL	
2000 ng/mL		2000 ng/mL		2000 ng/mL	

2. その他

気になった点、試験中のトラブルなど