

研究課題名 (研究項目名)	食品用ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量の推定に関する研究（課題番号：1603） （1 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積 （3）食品の器具・容器包装から溶出する化学物質についての研究）
主任研究者	研究者名：尾崎 麻子 所属機関：地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 28 年度～平成 29 年度（2 年間）

2 研究目的

ポリエチレンテレフタレート（PET）は、透明性に優れ、強靱でガスバリア性に優れる合成樹脂であり、食品用容器包装においては PET 製ボトル（ペットボトル）として汎用されている。特に清涼飲料、調味料及び酒類に使用されるペットボトル用樹脂の需要は2000年には36万トンであったのに対し、2014年には倍近い61万トンとなっており、今もなお増加傾向にある。

ペットボトルから食品へ溶出する可能性のある化学物質として、合成原料由来であるモノマー類、重合触媒である金属類、その他に副生成物や分解物などがある。国内を流通するペットボトルの材質中には、重合触媒であるアンチモンやゲルマニウム、副生成物である環状オリゴマー、分解物であるアセトアルデヒド、ホルムアルデヒド等が含有されていることが報告されているが、溶出量に関する知見は少なく、摂取量を評価するためのデータが不足している。さらに、ペットボトルの材質中には上記以外にも様々な種類の未知オリゴマー、添加剤や金属類が含有されている可能性がある。

本研究では、国内で使用されているペットボトルを対象として、溶出する可能性のある化学物質を誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析計（HS-GC-MS）、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）等を用いて探索・同定する。それらについて、食品擬似溶媒を用いた溶出試験を実施し、溶出量と食品分配係数及び消費係数より推定ばく露量を算出することを目的とする。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
（１）ペットボトルから溶出する金属類及び揮発性物質の定性・定量ならびに推定摂取量の算出	ペットボトルから溶出する金属類の定性・定量	尾崎麻子（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所） 研究協力者 岸 映里、大嶋智子（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）
	ペットボトルから溶出する揮発性物質の定性・定量ならびに推定摂取量の算出	尾崎麻子（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所） 研究協力者 岸 映里、角谷直哉（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）
（２）高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析	高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析	静間基博（地方独立行政法人大阪産業技術研究所） 研究協力者 小野大助（地方独立行政法人大阪産業技術研究所） 山本敦史（公立大学法人公立鳥取環境大学） 村上太郎（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）
（３）ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量	ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量	山本敦史（公立大学法人公立鳥取環境大学） 研究協力者 尾崎麻子、岸 映里（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）
（４）ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量	ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量	平成28年度分担研究者：阿部 裕（国立医薬品食品衛生研究所） 平成29年度分担研究者：六鹿元雄（国立医薬品食品衛生研究所） 研究協力者 山口未来（国立医薬品食品衛生研究所）

4 倫理面への配慮について

必要なし（実験動物等を用いた研究は実施せず）。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目名：食品用ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量の推定に関する研究

ペットボトルのリスク評価における摂取量推定に必要とされる溶出物質の同定と定量を目的とする。具体的には、我が国で使用されている主に清涼飲料水用のペットボトル（コールド用、ホット用）を対象とする。まず、溶出する可能性のある化学物質を物性ごとに適した分析装置を用いて探索・同定したのち、食品擬似溶媒（水、4%酢酸及び50%エタノール）を用いて短期間及び長期間の溶出試験を行い、それらの定量を行う。得られた溶出量と食品分配係数及び消費係数より推定ばく露量を算出することを目的とする。

（研究成果、考察等）

我が国の市場で多く使用されているペットボトルを試料とし、溶出試験方法は実際に飲料メーカーがペットボトルに飲料を充填する工程に可能な限り倣うことによって、より正確な摂取量推定が可能となる。そこで、国内のペットボトルや飲料に関わる協議会及び工業会、並びに飲料メーカーより情報収集を行い、ペットボトルの製造方法や飲料の充填方法、清涼飲料水の種類別消費量などの情報を得た。また、国内において多く消費されているペットボトル、すなわち、国内の大手ペットボトルメーカーが製造、もしくは飲料メーカーが実際に使用している飲料を充填する前の未使用の清涼飲料用ペットボトル計16試料をPETボトル協議会より提供を受け、本研究の試料とした（表1）。

表1 試料とした未使用のペットボトル一覧

試料	サンプルボトル情報			原料PET樹脂情報		
	ボトル分類	商品用途	バリアー付加の有無	国産/輸入	触媒	共重合の有無
A	耐熱ボトル	お茶系	なし	国産材	Ge系	なし
B	耐熱ボトル	お茶系	なし	輸入材	Ti系	なし
C	耐熱ボトル	お茶系	あり(ナイロン積層)	国産材	Ge系	なし
D	耐熱ボトル	お茶系	あり(内面カーボン系コーティング)	国産材	Ge系	なし
E	耐熱ボトル	お茶系	あり(内面カーボン系コーティング)	輸入材	Ti系	なし
F	耐熱ボトル	炭酸飲料	なし	輸入材	Sb系	あり*
G	耐圧ボトル	炭酸飲料	なし	輸入材(台湾)	Sb系	あり*
H	耐熱圧ボトル	果汁炭酸飲料	なし	国産材	Ge系	なし
I	耐熱圧ボトル	果汁炭酸飲料	なし	輸入材	Ti系	なし
J	無菌炭酸充填用ボトル	果汁炭酸飲料	なし	輸入材(台湾)	Sb系	あり*
K	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材(中国)	Sb系	あり*
L	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材	Sb系	あり
M	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材	Sb系	あり
N	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材(台湾)	Sb系	あり*
O	無菌充填用ボトル	ミネラルウォーター	なし	輸入材(韓国)	Sb系	あり*
P	無菌充填用ボトル	ミネラルウォーター	なし	輸入材	Sb系	あり*

*イソフタル酸少量共重合

(1) 個別課題名：ペットボトルから溶出する金属類及び揮発性物質の定性・定量ならびに推定摂取量の算出（尾崎麻子（地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所））

1) ペットボトルから溶出する金属類の定性・定量

ペットボトルに重合触媒として用いられているアンチモン（Sb）、ゲルマニウム（Ge）及びチタン（Ti）ならびに有害元素やその他添加剤として用いられる可能性のある元素について、一斉分析が可能な分析法を確立する。分析機器は、高感度で多元素分析が可能な誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）を用いる。分析法を確立したのち、ペットボトルの溶出液について上記元素の定量を行う。また、その際に分析対象外の元素の溶出有無もスクリーニングし、必要に応じて一斉分析法の対象とし、定量する。

（研究成果）

① 金属類の材質試験法の確立及びバリデーション

ペットボトルの重合触媒として使用される可能性のある元素（Ge、Sb、Ti、アルミニウム、コバルト、マグネシウム、亜鉛、マンガン、リチウム）や有害元素（ヒ素、クロム、カドミウム、鉛）のほか、安定剤や充填剤、着色剤などの添加剤として使用されることがある元素（リン、カリウム、ナトリウム、カルシウム、銀、タングステン、ニッケル、銅、バリウム、鉄、スズ）を含む全 34 元素について、細切したペットボトルをマイクロウェーブ分解装置で前処理後、ICP-MS 及び誘導結合プラズマ発光分光分析計（ICP-OES）で測定する迅速・簡便で精度の高い一斉分析法を確立した。測定対象とした 34 元素のうちリン（P）については ICP-MS おいて干渉がみられたため、より感度良く測定できる ICP-OES を使用し、33 元素は ICP-MS で測定した。

本法のバリデーションを行うために、Sb、Ge 及び Ti 触媒を用いて製造されたペットボトルを用いて、分析者 1 名、2 試行で 5 日間の枝分かかれ試験を実施した。器具・容器包装に関する試験法の妥当性を評価する基準は示されていないため、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、平成 20 年 9 月 26 日、食安発第 0926001 号）に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を求めた。各性能パラメーターの目標値は、添加濃度が $10 \mu\text{g/g}$ の場合、真度は 80～110%、併行精度は 10%未満、室内再現精度は 15%未満とし、添加濃度が $100 \mu\text{g/g}$ の場合、真度は 90～110%、併行精度は 10%未満、室内再現精度は 15%未満とした。その結果、すべての元素において真度は 95～107%、併行精度は 3.7%以下、室内再現精度は 8.2%以下であり、すべての性能パラメーターが目標値を満たしていた（表 1-1-1）。

本法は前処理にマイクロウェーブ装置を、測定機器に ICP-MS 及び ICP-OES を用いた試験法である。揮散しやすい元素の損失を防ぎ、環境や他試料からのコンタミネーションを最小限にすることができ、高感度、高精度で多元素同時分析が可能な試験法を確立した。

表1-1-1 金属類の材質試験法の妥当性評価

元素	定量下限 ($\mu\text{g/g}$)	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	ボトルE (Ti触媒)				ボトルH (Ge触媒)				ボトルP (Sb触媒)			
			真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定
Cd	0.05	10	99.5	1.3	2.3	○	99.8	1.1	1.6	○	99.8	1.0	2.4	○
U	0.05	10	96.3	1.3	2.0	○	95.9	0.9	0.9	○	95.7	2.2	2.7	○
Sb	0.1	10	98.6	1.4	6.1	○	97.4	0.8	3.9	○	-	-	-	-
Ag	0.5	10	97.9	1.3	2.6	○	97.9	1.0	3.3	○	98.1	1.1	2.2	○
As	0.5	10	103.1	0.9	3.1	○	102.8	0.8	3.5	○	102.8	0.9	2.4	○
Co	0.5	10	96.1	1.1	2.3	○	96.9	1.3	3.0	○	97.1	0.7	2.5	○
Cs	0.5	10	97.4	1.1	2.0	○	97.5	0.8	2.0	○	97.6	1.0	1.5	○
Ge	0.5	10	98.9	0.7	2.5	○	-	-	-	-	99.3	0.9	1.9	○
Li	0.5	10	100.8	1.7	2.6	○	100.3	1.4	2.0	○	99.9	1.1	2.8	○
Mn	0.5	10	98.5	1.2	2.1	○	98.6	0.8	2.0	○	99.0	1.1	1.6	○
Mo	0.5	10	99.4	0.7	2.3	○	99.8	0.8	2.5	○	99.9	1.1	1.9	○
Pb	0.5	10	99.2	1.1	2.3	○	98.3	1.0	2.3	○	99.0	1.9	1.9	○
Rb	0.5	10	97.4	0.7	3.7	○	97.8	0.7	3.9	○	98.1	0.7	4.4	○
Se	0.5	10	102.6	1.5	2.5	○	103.8	2.4	3.6	○	102.4	2.3	2.9	○
Sr	0.5	10	97.4	0.6	2.7	○	97.9	0.8	2.5	○	98.1	0.5	2.6	○
V	0.5	10	97.8	0.9	1.8	○	99.2	0.7	2.5	○	99.5	1.1	2.7	○
Zr	0.5	10	97.6	0.7	2.2	○	98.3	0.5	2.0	○	98.3	0.9	1.6	○
Cr	1	10	101.6	1.4	2.5	○	101.6	0.7	2.1	○	102.4	1.0	1.4	○
Ni	1	10	97.6	1.0	1.7	○	98.2	1.5	2.2	○	98.1	0.8	1.5	○
Sn	1	10	97.6	1.1	2.1	○	99.5	0.7	3.1	○	99.4	0.5	2.0	○
Ti	1	10	-	-	-	-	107.2	0.8	4.0	○	106.7	1.9	4.5	○
W	1	10	101.1	0.6	4.4	○	100.9	1.1	5.0	○	100.4	0.7	4.0	○
Ba	2	10	96.7	1.2	1.4	○	96.4	0.9	1.7	○	96.8	1.3	1.4	○
Cu	2	10	95.0	0.6	1.9	○	96.4	0.6	1.3	○	97.0	1.2	1.4	○
Ga	2	10	99.9	0.8	3.1	○	101.3	0.8	4.2	○	101.6	1.1	3.9	○
B	5	10	99.6	1.7	3.7	○	98.8	1.5	3.5	○	98.6	1.1	4.2	○
Mg	5	10	97.0	3.4	5.4	○	97.5	0.8	3.9	○	99.1	1.0	4.3	○
Al	10	100	98.6	1.6	2.5	○	102.4	3.6	7.0	○	98.9	1.1	3.2	○
Fe	10	100	97.3	1.8	4.4	○	97.9	1.6	4.3	○	98.3	3.7	6.2	○
P	10	100	104.1	1.5	4.3	○	96.8	0.8	3.0	○	99.5	0.8	2.9	○
Zn	10	100	99.4	0.9	1.7	○	99.9	1.1	2.0	○	100.6	1.1	1.9	○
Ca	50	100	101.1	2.1	3.1	○	101.8	0.5	2.1	○	101.7	2.8	4.2	○
K	50	100	97.3	1.3	4.6	○	97.7	1.5	5.3	○	98.2	1.7	5.8	○
Na	50	100	98.7	2.6	6.3	○	98.3	2.2	6.7	○	102.0	3.3	8.2	○

(1人×n=2×5日間)

② 金属類の材質含有量の定量

①で確立した試験法を用いて、ペットボトル 16 試料の 34 元素の材質含有量を測定した。その結果を表 1-1-2 に示す。重合触媒として Sb、Ge 及び Ti がそれぞれ $0.3\sim 279\mu\text{g/g}$ 、 $42\sim 50\mu\text{g/g}$ 及び $7\sim 26\mu\text{g/g}$ 含有されていることを明らかにした。その他添加剤として、コバルト (Co) 及び P がそれぞれ $12\sim 53\mu\text{g/g}$ 及び $10\sim 48\mu\text{g/g}$ 含有されていた。一方、カドミウム、鉛、ヒ素、クロム等の有害元素を含むその他の 29 元素はすべてのペットボトル試料において定量下限値未満であった。

以上より、未使用のペットボトル 16 試料には Ge、Ti、Sb、P 及び Co の 5 元素が含有されており、これらが飲料へ溶出する可能性があることがわかった。

表 1-1-2 未使用ペットボトル中の金属類の材質含有量

No.	触媒	材質中含有量 (μg/g) ^a				
		Ge	Ti	Sb	Co	P
A	Ge	48 ± 0.9	ND	ND	ND	31 ± 0.3
C	Ge	42 ± 0.3	ND	ND	53 ± 1.5	48 ± 0.6
D	Ge	48 ± 0.2	ND	ND	ND	31 ± 0.1
H	Ge	50 ± 0.4	ND	ND	ND	29 ± 0.9
B	Ti	ND	26 ± 0.2	0.6 ± 0.0	ND	10 ± 0.2
E	Ti	ND	8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	ND	ND
I	Ti	ND	7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	ND	ND
F	Sb	ND	ND	257 ± 1.7	ND	ND
G	Sb	ND	ND	279 ± 2.8	ND	ND
J	Sb	ND	ND	179 ± 2.2	12 ± 0.1	18 ± 0.4
M	Sb	ND	ND	177 ± 2.3	ND	12 ± 0.4
L	Sb	ND	ND	151 ± 0.5	ND	11 ± 0.4
N	Sb	ND	ND	172 ± 2.3	16 ± 0.1	18 ± 0.0
K	Sb	ND	ND	257 ± 1.6	ND	ND
O	Sb	ND	ND	261 ± 2.7	14 ± 0.1	17 ± 0.3
P	Sb	ND	ND	249 ± 6.2	ND	ND
定量下限 (μg/g)		0.5	1	0.1	0.5	10

^a 平均値 ± SD (n=3)、ND : 定量下限未満

③ 金属類の溶出試験法の確立及びバリデーション

溶出量を定量するために試験法の確立及びバリデーションを試みた。②でペットボトルの材質中に含まれていた Ge、Ti、Sb、P 及び Co の5元素を対象とし、食品擬似溶媒には、食品衛生法において pH 5を超える中性食品及び pH 5以下の酸性食品の食品擬似溶媒として使用されている水及び4%酢酸とともに、EU でアルコール性食品及び乳製品の食品擬似溶媒として使用されている50%エタノールを用いた。

水溶出液は硝酸を添加し、4%酢酸溶出液はそのまま試験溶液とした。50%エタノール溶出液は加熱してエタノールを除去した後、硝酸を添加し、蒸留水で定容したものを試験溶液とした。測定には ICP-MS を用いた。分析者1名が2試行で5日間の枝分かかれ試験を実施し、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を算出した。各性能パラメーターの目標値は、真度は80～120%、併行精度は15%未満、室内再現精度は20%未満とした。その結果を表1-1-3に示した。すべての元素において真度は94～105%、併行精度は5.4%以下、室内再現精度は8.0%以下であり、いずれの性能パラメーターも目標値を満たしていた。

表1-1-3 金属類の溶出試験法の妥当性評価

元素	定量下限 (ng/mL)	添加量 (ng/mL)	水				4%酢酸				50%エタノール			
			真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現 精度(%)	判定
Co	0.1	1	99.7	5.1	5.4	○	100.8	2.1	4.5	○	94.2	2.3	5.2	○
Ge	0.1	1	100.8	5.4	5.4	○	103.4	3.0	3.0	○	95.9	2.8	6.4	○
Sb	0.1	1	102.2	4.6	4.6	○	105.0	3.2	4.5	○	97.8	2.8	5.8	○
Ti	2	20	99.4	2.3	3.9	○	99.1	1.7	3.0	○	95.1	2.3	4.8	○
P	20	50	100.8	2.3	6.2	○	104.8	2.0	3.0	○	99.7	3.1	8.0	○

(1人×n=2×5日間)

④ 未使用のペットボトルを用いた短期間溶出試験（10日間、25、40、60℃）

ペットボトル 16 試料のうち、検出された元素やその組成が異なる耐熱・耐熱圧ボトル 4 試料及び非耐熱ボトル 4 試料の計 8 試料を選定し、短期間の溶出試験を実施した。それぞれのペットボトルに食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは 50%エタノールを充填し、25、40、60℃で 10 日間保存し、Ge、Ti、Sb、Co 及び P の 5 元素を測定した。ただし、60℃は耐熱・耐熱圧ボトルを対象とし、水及び 4%酢酸溶出液のみ実施した。

その結果、Ge 触媒で製造された耐熱・耐熱圧ボトルにおいて、水、4%酢酸及び 50%エタノールへの Ge 溶出量は 0.1～16、0.1～18 及び 0.2～7.2 ng/mL であった（図 1-1-1）。Sb 触媒で製造された非耐熱ボトルにおいて、水、4%酢酸及び 50%エタノールへの Sb 溶出量は 0.1～0.6、0.1～0.8 及び 0.1～1.8 ng/mL であった（図 1-1-2）。Ge 及び Sb のいずれにおいても 3 種類の食品擬似溶媒では 50%エタノールへの溶出量が高く、保存温度が高くなるほど溶出量は増加した。Ti、Co 及び P はすべての条件で定量下限値（2、0.1 及び 20 ng/mL）未満であった。

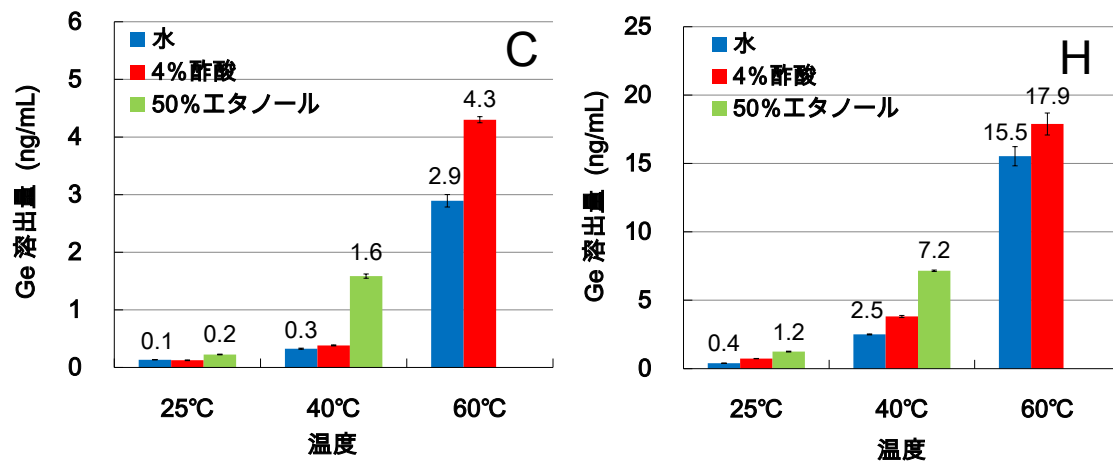


図 1-1-1 短期間溶出試験における Ge 溶出量

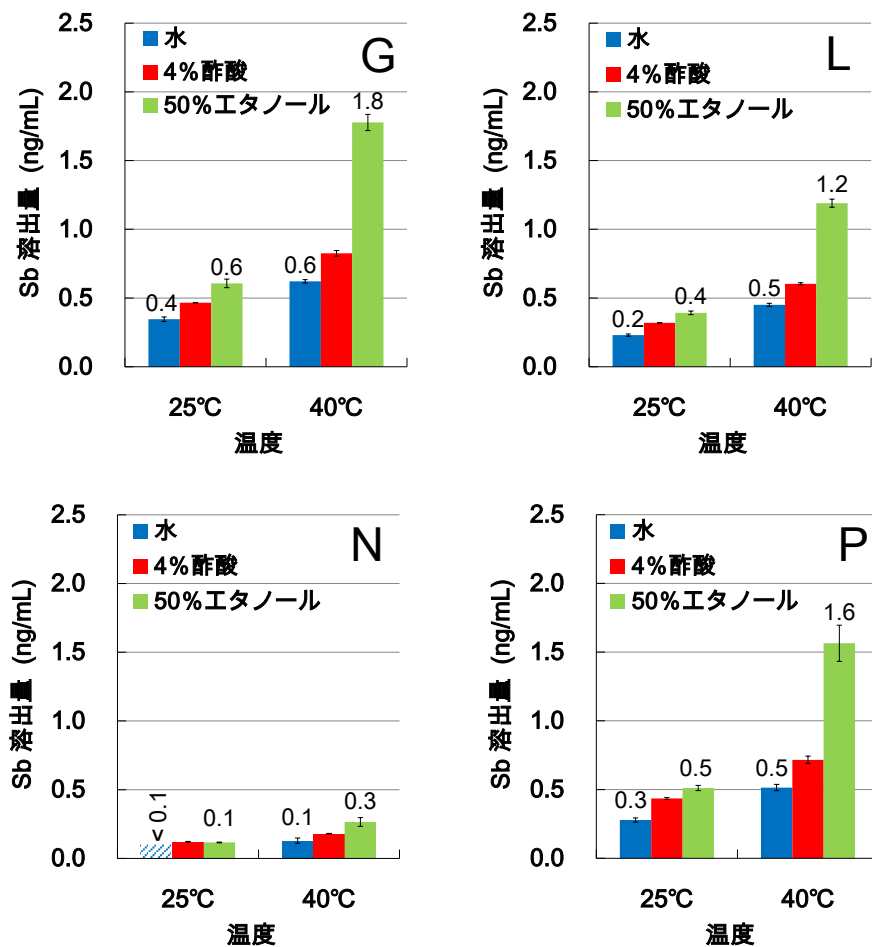


図 1-1-2 短期間溶出試験における Sb 溶出量

⑤ 未使用のペットボトルを用いた長期間溶出試験（10 日間～12 ヶ月、25℃）

④と同様の未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは 50%エタノールを充填し、25℃で 10 日、3、6、9、12 ヶ月間保存し、対象とした元素を測定した。その結果、Ge 溶出量は 10 日間～12 ヶ月まで増加し続け、12 ヶ月における水、4%酢酸及び 50%エタノールへの Ge 溶出量はそれぞれ 0.7～6.7 ng/mL、0.8～7.5 ng/mL 及び 2.9～13.8 ng/mL であった（図 1-1-3）。一方、Sb 溶出量は、水及び 50%エタノールでは 10 日間～6 ヶ月まで増加し、6 ヶ月以降はほぼ平衡に達していることが示唆されたが、4%酢酸では 12 ヶ月まで緩やかに増加した（図 1-1-4）。12 ヶ月における水、4%酢酸及び 50%エタノールへの Sb 溶出量はそれぞれ 0.2～0.7 ng/mL、0.3～1.1 ng/mL 及び 0.2～1.0 ng/mL であった。Ti、Co 及び P はすべての条件で定量下限値（2、0.1 及び 20 ng/mL）未満であった。

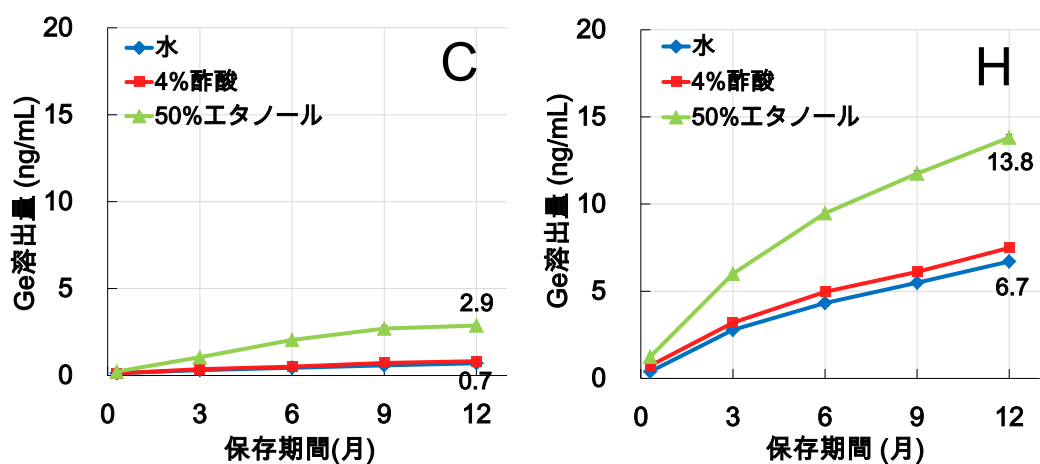


図 1-1-3 長期間溶出試験における Ge 溶出量

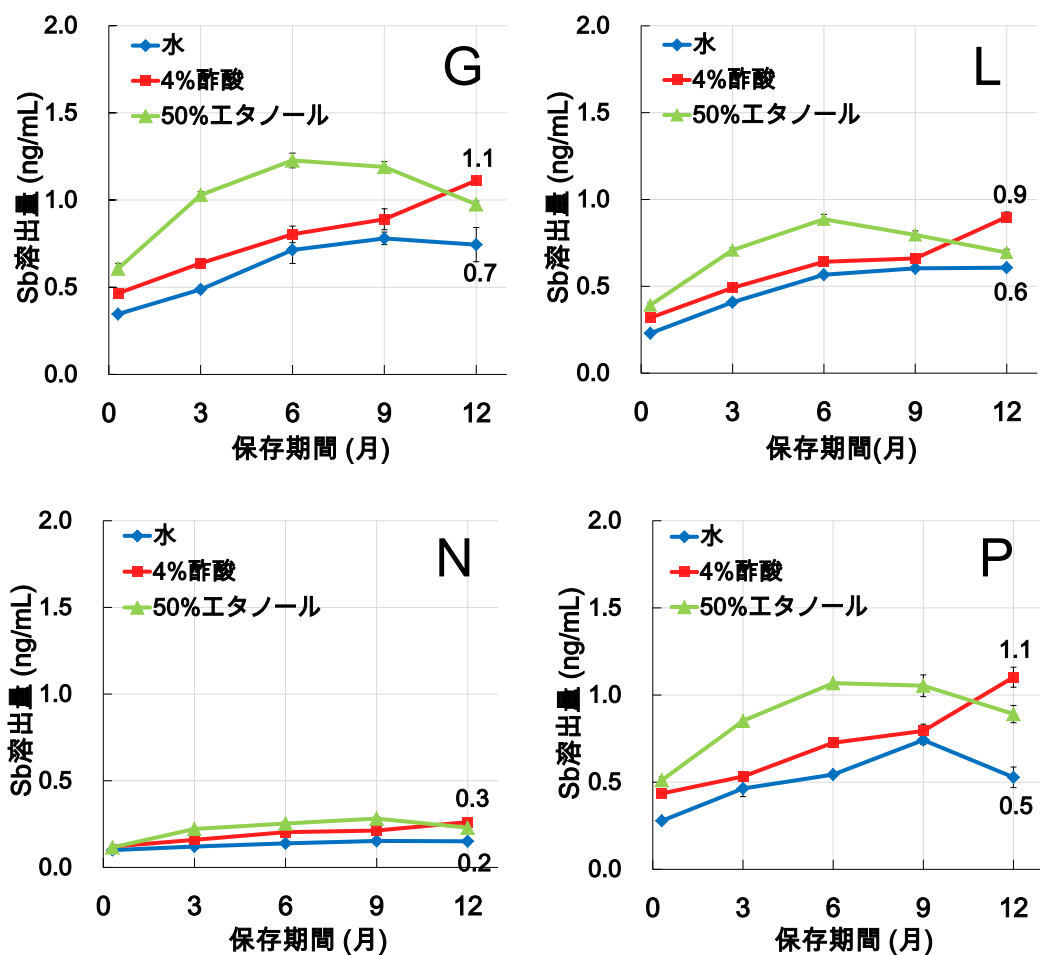


図 1-1-4 長期間溶出試験における Sb 溶出量

⑥ 市販ミネラルウォーターの実態調査

市販されている国内及び海外製のミネラルウォーターについて含有されている Ge 及び Sb の定量を行い、実態調査を実施した。試料は国内のスーパーやコンビニエンスストア等で一般的に販売されている国内及び海外製品各 4 試料の計 8 試料と、インターネット等で購入した様々な国で製造された海外製品 13 試料の計 21 試料とした。その結果、Ge は No. 8、13 及び 19 の 3 試料で 0.1～0.4 ng/mL 検出され、Sb は No. 3 を除く 20 試料で 0.1～1.6 ng/mL 検出された（表 1-1-4）。海外ではペットボトル製造には一般的に Sb 触媒が使用され、Ge 触媒はほぼ使用されていないため、海外製品 3 試料から検出された Ge は原材料の水に由来する可能性が高いと考えられた。Sb 濃度の範囲は、日本製品で 0.2～0.5 ng/mL、北米製品で 0.1～0.4 ng/mL、EU 製品で 0.4～1.6 ng/mL であった。日本の製品中 Sb 濃度は食品擬似溶媒として水を用いた未使用のペットボトルの溶出試験結果（10 日～12 ヶ月）とほぼ同等であった。

表1-1-4 市販ミネラルウォーターの実態調査結果

No.	名称	原材料名	採水地 (国・地域)	内容量 (mL)	硬度 (mg/L)	pH (表示)	試料中濃度 (ng/mL) ^a	
							Ge	Sb
1	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱水）	鳥取県西伯郡	555	40.3	無記載	ND	0.46 ± 0.01
2	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱水）	鳥取県日野郡	550	約20	約7	ND	0.34 ± 0.01
3	ボトルドウォーター	水（鉱水）	静岡県焼津市	500	64	8.8～9.4	ND	ND
4	ナチュラルミネラルウォーター	水（深井戸水）	神戸市西区	600	32	7.2	ND	0.22 ± 0.01
5	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	フランス	500	60	7	ND	1.2 ± 0.01
6	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	フランス	500	304	7.2	ND	0.82 ± 0.02
7	スプリングミネラルウォーター	水（湧水）	アメリカ	500	38	無記載	ND	0.14 ± 0.00
8	無記載	無記載	アメリカ	500	無記載	無記載	0.10 ± 0.00	0.37 ± 0.00
9	ボトルドウォーター	水（氷河湖水）	アメリカ	500	79	7.4	ND	0.30 ± 0.01
10	清涼飲料水 （ビュアウォーター）	深井戸水	アメリカ	500	無記載	無記載	ND	0.16 ± 0.00
11	ミネラルウォーター	水（氷河水）	カナダ	500	27.5	7	ND	0.14 ± 0.00
12	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	韓国	500	18	7.0～8.0	ND	1.0 ± 0.04
13	ナチュラルミネラルウォーター	水（湧水）	フィジー	600	158	8.1	0.27 ± 0.01	0.76 ± 0.03
14	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	ニュージーランド	500	10	無記載	ND	0.13 ± 0.01
15	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	ルーマニア	500	無記載	無記載	ND	1.6 ± 0.02
16	炭酸入りミネラルウォーター	水（鉱水）	ルーマニア	500	無記載	無記載	ND	0.97 ± 0.05
17	無記載	無記載	イタリア	500	無記載	無記載	ND	0.56 ± 0.02
18	ナチュラルミネラルウォーター （炭酸入り）	水（鉱水）、炭酸	ドイツ	500	1006.9	6.3	ND	1.3 ± 0.02
19	ナチュラルミネラルウォーター	無記載	フランス	500	無記載	7.8	0.38 ± 0.01	1.2 ± 0.04
20	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	スコットランド	500	22	6.1	ND	0.44 ± 0.01
21	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	スコットランド	500	143	約7	ND	0.50 ± 0.02

^a 平均値 ± SD (n=3)、ND: 定量下限 (0.1 ng/mL) 未満

国内及び海外製品各 4 試料について、室温（25℃）で 6 ヶ月まで保管し、Sb の経時変化をみた。その結果、No. 3 の Sb 濃度は 6 ヶ月後も定量下限値（0.1 ng/mL）未満であったが、その他 7 試料の Sb 濃度は、未使用のペットボトルの溶出試験結果と同様に、保存期間が長くなるとともに緩やかに増加し、6 ヶ月後の Sb 濃度は 0.2～1.5 ng/mL であった（図 1-1-5）。

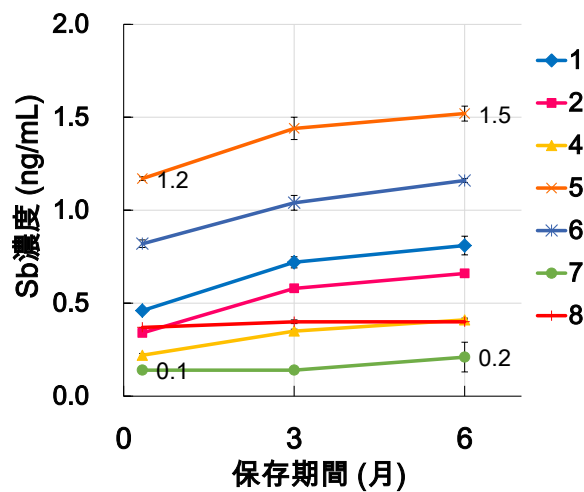


図 1-1-5 市販ミネラルウォーターを室温保管したときの Sb 濃度

⑦ まとめ及び考察

ペットボトルから溶出する可能性のある金属類の探索を行うため、ペットボトル材質中に含まれる金属類 34 元素の一斉分析法を検討した。前処理にマイクロウェーブ分解装置を、測定機器に ICP-MS 及び ICP-OES を用いることで、迅速・簡便で精度の高い一斉分析法を確立することができた。本法を用いて、未使用のペットボトル 16 試料の材質中金属類の分析を行ったところ、Ge、Ti、Sb、P 及び Co の 5 元素が含有されており、これらが飲料へ溶出する可能性があることが判明した。

これらの元素の溶出傾向を調べるため、含有元素組成の異なる未使用のペットボトル 8 試料を選定し、食品擬似溶媒（水、4%酢酸もしくは 50%エタノール）を充填して溶出試験を行った。溶出液中の元素濃度は ICP-MS により精度良く測定でき、Ge 及び Sb 溶出量は保存温度が高く、保存期間が長くなるほど増加する傾向がみられた。3 種類の食品擬似溶媒では 50%エタノールへの溶出量が高かった。50%エタノールは PET 樹脂中に浸透しやすいため溶出量が高くなったと推測された。また、全般的に Ge は Sb よりも材質中含量は低かったが、溶出量は高かった。触媒として使用されている二酸化ゲルマニウム (GeO_2) 及び三酸化アンチモン (Sb_2O_3) の水溶解度は 4.47 g/L (25℃) 及び 0.014 g/L (30℃) であり、Sb より Ge のほうが溶けやすいことから溶出率に差がみられたと考えられた。25℃10 日～12 ヶ月における水への Ge 及び Sb 溶出量は 0.1～6.7 ng/mL 及び <0.1～0.7 ng/mL であり、市販ミネラルウォーターの実態調査においても概ね同程度の Sb が検出された。これらは食品衛生法における規格基準値 (4%酢酸、60℃30 分: Ge 100 ng/mL 及び Sb 50 ng/mL) の 15 分の 1 以下であり、大きく下回っていた。

2) ペットボトルから溶出する揮発性物質の定性・定量ならびに推定摂取量の算出

ペットボトルに含有される揮発性物質について報告した例は限られているが、材質中に2-メチル-1,3-ジオキソランが含有されていることが報告されている。本物質は残存モノマーのエチレングリコールとPET分解物である酢酸から加熱時に生成する。上記物質以外にも、ペットボトル材質中に揮発性物質が含有されている可能性が考えられることより、これらの探索を行い、溶出液について定量を行う。分析機器は揮発性物質の定性及び定量が可能なヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析計（HS-GC-MS）を用いる。

（研究成果）

① 揮発性物質の探索及び同定

材質に含有される揮発性物質を探索・同定するため、細切したペットボトル試料をヘッドスペース用バイアルに精秤し、蒸留水を加えたのち、HS-GC-MS 分析を行った。検出された各ピークについて NIST によるライブラリ検索を行い、マススペクトルの類似度が高い物質を候補として挙げた。候補物質の標準品を入手し、検出されたピークと各標準品の保持時間及びマススペクトルを比較して同定を行った。その結果、アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール、デカナールが同定された（表 1-2-1）。ボトル M のトータルイオンクロマトグラムを図 1-2-1 に示した。

アセトアルデヒド及びノナナールはほぼ全ての試料から検出されたが、2-メチル-1,3-ジオキソランは主に非耐熱ボトルである無菌充填用ボトルから検出された。また、ナイロン積層ボトル（ボトル C）においてのみシクロペンタノン及びベンズアルデヒドが同定され、これらはナイロン層由来と推測された。

表 1-2-1 HS-GC-MS によりペットボトル材質中に同定された化学物質

試料	ボトル分類	同定された化学物質
A	耐熱ボトル	ノナナール、デカナール
B	耐熱ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール、デカナール
C	耐熱ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール、シクロペンタノン、ベンズアルデヒド
D	耐熱ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
E	耐熱ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
F	耐熱ボトル	—
G	耐圧ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
H	耐熱圧ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
I	耐熱圧ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
J	無菌炭酸充填用ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール
K	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール
L	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール
M	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール
N	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール
O	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、ノナナール、デカナール
P	無菌充填用ボトル	アセトアルデヒド、2-メチル-1,3-ジオキソラン、ノナナール

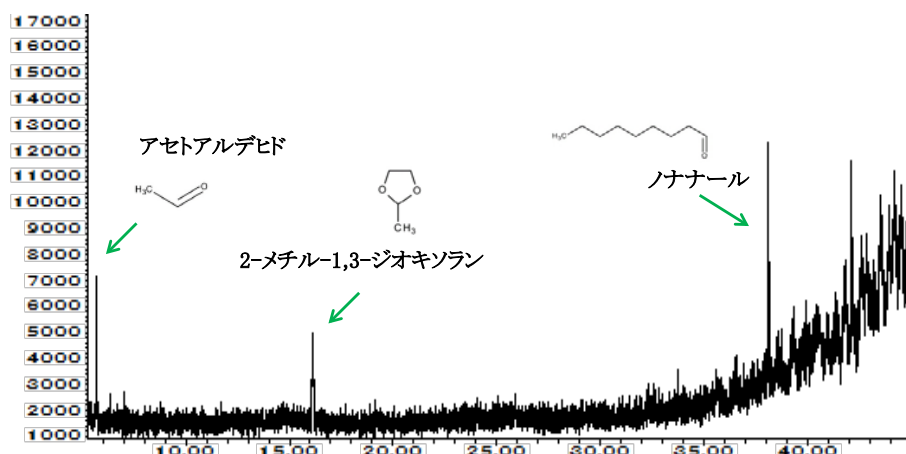


図 1-2-1 ボトル M の HS-GC-MS クロマトグラム

② 揮発性物質の溶出試験法の確立及びバリデーション

溶出量を測定するための試験法の確立を試みた。①で同定した 6 物質のうち、アセトアルデヒドについては個別課題（4）において検討していることから、本個別課題ではそれ以外の 5 物質を対象とした。水溶出液をヘッドスペース用バイアルにとり、HS-GC-MS で測定して定量下限を検討したところ、1～10 ng/mL とやや高かった。ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量を概算するためには、より低いレベルまで定量することが望ましい。そこで、さらに感度よく測定するために、パージ&トラップ（PT）-GC-MS を用いた試験法を検討した。パージ条件等を検討した結果、水溶出液において定量下限値は 0.01～0.5 ng/mL であり、HS-GC-MS と比べて 100 倍程度高感度な定量が可能となった。さらに、PT-GC-MS 法では、HS-GC-MS においてエタノールの妨害により定量が困難であった 50%エタノール溶出液についても、水で希釈することにより測定が可能となった。

本法のバリデーションを分析者 1 名、2 試行で 5 日間の枝分かれ試験により実施した。添加濃度は、定量下限値の約 10 倍もしくは実試料から検出される濃度を参考に設定した。器具・容器包装に関する試験法の妥当性を評価する基準は示されていないため、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（厚生労働省医薬食品局食品安全性部長通知、平成 22 年 12 月 24 日、食安発 1224 第 2 号）に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を求めた。各性能パラメーターの目標値はこのガイドラインを参考に、添加濃度が 100 ng/g 以下の場合、真度は 70～120%、併行精度は 15%未満、室内再現精度は 20%未満とし、添加濃度が 500 ng/g の場合、真度は 70～120%、併行精度は 10%未満、室内再現精度は 15%未満とした。その結果を表 1-2-2 及び 1-2-3 に示す。2-メチル-1,3-ジオキソランは無添加試料から検出されたため、差し引いて真度を算出した。水溶出液及び 50%エタノール溶出液において、真度は 100.3～106.7%及び 100.4～105.4%、併行精度は 2.0～3.4%及び 0.9～3.0%、室内再現精度は 2.7～5.3%及び 0.9～8.8%と良好であり、全て目標値を満たしていた。本法は水溶出液はそのまま、50%エタノール溶出液は蒸留水で 100 倍希釈後に測定が可能であるため、非常に簡便で、精度が高く、迅速な高感度一斉分析法の確立に成功した。

表 1-2-2 揮発性物質の溶出試験法（水溶出液）の妥当性評価

	定量下限値 (ng/mL)	添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
2-メチル-1,3-ジオキソラン	0.01	1	102.1	2.0	4.6	○
シクロペンタノン	0.1	1	100.3	2.7	5.3	○
ベンズアルデヒド	0.5	5	106.7	2.4	2.7	○
デカナール	0.5	5	103.7	3.4	4.4	○
ノナナール	0.5	5	102.2	3.4	3.4	○

(1人×n=2×5日間)

表 1-2-3 揮発性物質の溶出試験法（50%エタノール溶出液）の妥当性評価

	定量下限値 (ng/mL)	添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
2-メチル-1,3-ジオキソラン	1	10	100.4	3.0	4.4	○
		100	103.8	2.3	5.2	○
シクロペンタノン	10	100	102.3	2.7	8.8	○
ベンズアルデヒド	50	500	102.5	2.8	7.7	○
デカナール	50	500	105.4	1.8	1.8	○
ノナナール	50	500	103.6	0.9	0.9	○

(1人×n=2×5日間)

③ 未使用のペットボトルを用いた短期間溶出試験（10日間、25、40、60℃）

確立した試験法を用い、16 試料のうち、耐熱・耐熱圧ボトル 4 試料及び非耐熱ボトル 4 試料の計 8 試料について短期間の溶出試験を実施した。それぞれのペットボトルに食品擬似溶媒として水もしくは 50%エタノールを充填し、25、40、60℃で 10 日間保存し、対象とした揮発性物質を測定した。ただし、60℃は耐熱・耐熱圧ボトルを対象とし、水溶出液のみ実施した。その結果、2-メチル-1,3-ジオキソランが検出された（表 1-2-4 及び表 1-2-5）。

水溶出液において、25℃では耐熱・耐熱圧ボトルは全て定量下限未満だったが、40℃以上の溶出試験ではボトル E 以外の全てのボトルで溶出が認められた。溶出量は 25℃から 40℃に上げると約 8 倍、40℃から 60℃に上げると 3～5 倍となり、試験温度が高いほど溶出量は高くなった。50%エタノール溶出液では 40℃において非耐熱ボトルで溶出が認められ、試験温度が高いほど溶出量が高くなった。

表 1-2-4 短期間溶出試験（水溶出液）における 2-メチル-1,3-ジオキソラン溶出量

試料	ボトル分類	溶出量(ng/mL)		
		25℃10日	40℃10日	60℃10日
B	耐熱ボトル	ND	0.05 ± 0.003	0.27 ± 0.01
C	耐熱ボトル	ND	0.03 ± 0.003	0.09 ± 0.01
E	耐熱ボトル	ND	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	ND	0.16 ± 0.01	0.53 ± 0.07
G	耐圧ボトル	0.08 ± 0.003	0.63 ± 0.01	—
L	無菌充填用ボトル	0.09 ± 0.01	0.75 ± 0.04	—
N	無菌充填用ボトル	0.05 ± 0.01	0.39 ± 0.03	—
P	無菌充填用ボトル	0.10 ± 0.01	0.78 ± 0.02	—

ND < 0.01 ng/mL, 平均値±SD, n=3, -:実施せず

表 1-2-5 短期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における 2-メチル-1,3-ジオキソラン溶出量

試料	ボトル分類	溶出量(ng/mL)	
		25℃10日	40℃10日
B	耐熱ボトル	ND	ND
C	耐熱ボトル	ND	ND
E	耐熱ボトル	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	ND	ND
G	耐圧ボトル	ND	3.6 ± 0.80
L	無菌充填用ボトル	ND	3.8 ± 0.35
N	無菌充填用ボトル	ND	2.4 ± 0.30
P	無菌充填用ボトル	ND	5.1 ± 0.60

ND < 1 ng/mL, 平均値±SD, n=3

④ 未使用のペットボトルを用いた長期間溶出試験（10日間～12ヶ月、25℃）

③と同様の未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水もしくは 50%エタノールを充填し、25℃で 10 日、3、6、9、12 ヶ月間保存し、対象とした揮発性物質を測定した。その結果、短期間溶出試験と同様に、2-メチル-1,3-ジオキソランが検出された。

水溶出液において、耐熱・耐熱圧ボトル（B、C、E、H）では 3 ヶ月目からわずかに溶出し始め、12 ヶ月後では全ての試料から溶出が認められ、12 ヶ月後の溶出量は 0.04～0.36 ng/mL であった（図 1-2-2）。一方、非耐熱ボトル（G、L、N、P）では、全ての試料において 10 日目から溶出が見られ、12 ヶ月後の溶出量は耐熱・耐熱圧ボトルに比べて約 10 倍高かった。材質中のスクリーニングにおいても主に非耐熱ボトルから 2-メチル-1,3-ジオキソランが検出されていることから、材質含有量が高いことが推測された。

同様に 50%エタノール溶出液においても、耐熱・耐熱圧ボトルに比べて非耐熱ボトルで高い溶出量を示し、12 ヶ月後の溶出量はそれぞれ 1 ng/mL 未満～1.4 ng/mL 及び 3.8～12.1 ng/mL であり、非耐熱ボトルの溶出量が約 10 倍高かった（図 1-2-3）。

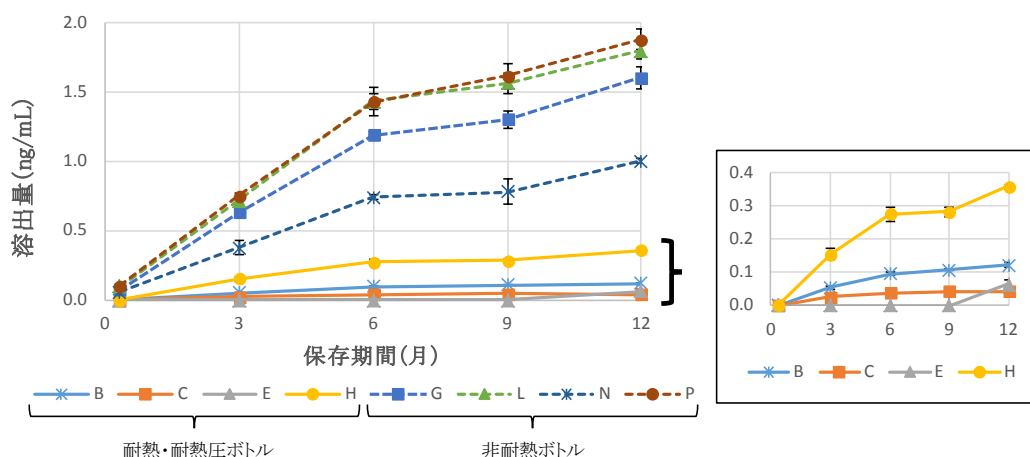


図 1-2-2 長期間溶出試験（水溶出液）における 2-メチル-1, 3-ジオキソラン溶出量

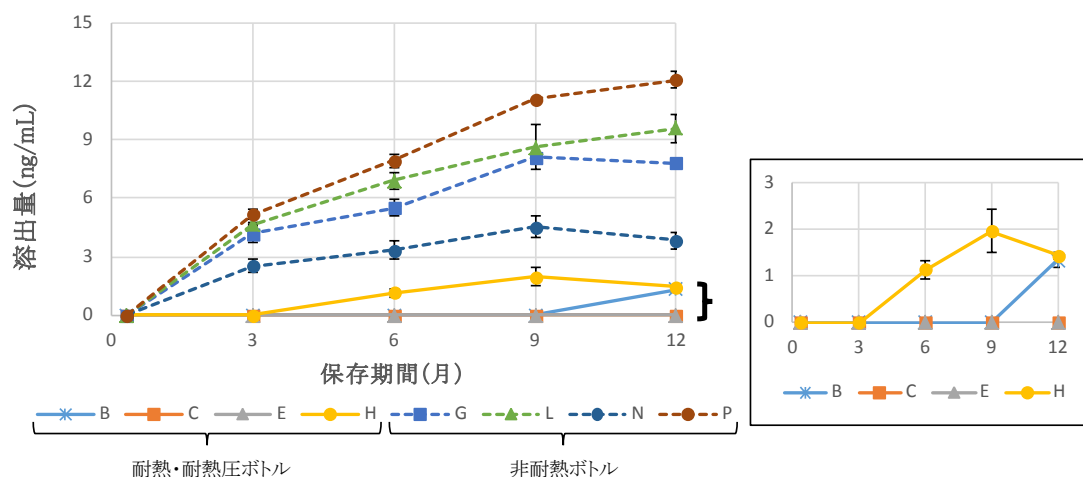


図 1-2-3 長期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における 2-メチル-1, 3-ジオキソラン溶出量

水及び 50%エタノール溶出液を比較すると、水に比べて 50%エタノールにおける溶出量が約 10 倍高かった。50%エタノールは水よりも PET 樹脂中に浸透しやすいため溶出量が高くなったと推測された。また、水溶出液では多くの試料で 12 ヶ月後まで溶出量が増え続けた。一方、50%エタノール溶出液では多くの試料において 9 ヶ月目まで溶出量が増え続けたが、12 ヶ月後にはわずかに増えるもしくは減少し、溶出量がほぼ平衡に達していることが示唆された。

なお、ノナナール、デカナール、シクロペンタノン及びベンズアルデヒドはいずれの試料及び保存条件においても定量下限値未満であった。

⑤ 市販ミネラルウォーターの実態調査

市販されている国内及び海外製のミネラルウォーターについて含有されている揮発性物質の定量を行い、実態調査を実施した。試料は国内のスーパーやコンビニエンスストア等で一般的に販売されている国内及び海外製品各 4 試料の計 8 試料と、インターネッ

ト等で購入した様々な国で製造された海外製品 13 試料の計 21 試料とした。その結果、一般的なミネラルウォーター8 試料からは、2-メチル-1, 3-ジオキソランが国内製品において 0.03~1.2 ng/mL、海外製品において 0.33~1.5 ng/mL 検出された（表 1-2-6）。インターネット等で購入した様々な海外製品においても 2-メチル-1, 3-ジオキソランが 0.52~3.1 ng/mL 検出されたが、3 試料からはノナナールが 0.54~1.8 ng/mL 検出された。未使用のペットボトルや国内製品からは溶出していないことから、これらのボトルに含まれるノナナール含有量が高かったと推測された。しかしながら、ノナナールが検出された 3 試料の製造国、水の硬度や pH 等に共通する特徴などは見られなかった。

21 試料すべてから検出されたメチル-1, 3-ジオキソランの濃度範囲は、日本製品で 0.03~1.2 ng/mL、北米製品で 0.33~1.1 ng/mL、EU 製品で 1.0~2.7 ng/mL であり、食品擬似溶媒として水を用いた未使用のペットボトルの溶出試験結果（10 日~12 ヶ月）とほぼ同等であった。

表 1-2-6 市販ミネラルウォーターの実態調査結果

No.	名称	原材料名	採水地 (国・地域)	内容量 (mL)	硬度 (mg/L)	pH (表示)	試料中濃度(ng/mL) ^a	
							2-メチル- 1,3-ジオキソラン	ノナナール
1	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱水）	鳥取県西伯郡	555	40.3	無記載	1.0 ± 0.03	ND
2	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱水）	鳥取県日野郡	550	約20	約7	0.97 ± 0.03	ND
3	ボトルドウォーター	水（鉱水）	静岡県焼津市	500	64	8.8~9.4	0.03 ± 0.00	ND
4	ナチュラルミネラルウォーター	水（深井戸水）	神戸市西区	600	32	7.2	1.2 ± 0.03	ND
5	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	フランス	500	60	7	1.0 ± 0.06	ND
6	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	フランス	500	304	7.2	1.5 ± 0.04	ND
7	スプリングミネラルウォーター	水（湧水）	アメリカ	500	38	無記載	0.33 ± 0.06	ND
8	無記載	無記載	アメリカ	500	無記載	無記載	0.55 ± 0.13	ND
9	ボトルドウォーター	水（氷河湖水）	アメリカ	500	79	7.4	0.66 ± 0.01	0.91 ± 0.10
10	清涼飲料水 （ピュアウォーター）	深井戸水	アメリカ	500	無記載	無記載	1.1 ± 0.04	ND
11	ミネラルウォーター	水（氷河水）	カナダ	500	27.5	7	0.52 ± 0.05	ND
12	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	韓国	500	18	7.0~8.0	0.55 ± 0.02	ND
13	ナチュラルミネラルウォーター	水（湧水）	フィジー	600	158	8.1	2.0 ± 0.08	ND
14	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	ニュージーランド	500	10	無記載	3.1 ± 0.05	1.8 ± 0.10
15	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	ルーマニア	500	無記載	無記載	2.2 ± 0.16	ND
16	炭酸入りミネラルウォーター	水（鉱水）	ルーマニア	500	無記載	無記載	1.0 ± 0.09	ND
17	無記載	無記載	イタリア	500	無記載	無記載	1.9 ± 0.15	ND
18	ナチュラルミネラルウォーター （炭酸入り）	水（鉱水）、炭酸	ドイツ	500	1006.9	6.3	1.6 ± 0.09	0.54 ± 0.10
19	ナチュラルミネラルウォーター	無記載	フランス	500	無記載	7.8	2.7 ± 0.03	ND
20	ナチュラルミネラルウォーター	水（鉱泉水）	スコットランド	500	22	6.1	1.3 ± 0.07	ND
21	ミネラルウォーター	水（鉱泉水）	スコットランド	500	143	約7	1.4 ± 0.06	ND

^a 平均値 ± SD (n=3)、ND: 定量下限 (0.5 ng/mL) 未満

④の未使用のペットボトルを用いた長期溶出試験において、経時変化とともに 2-メチル-1, 3-ジオキソランの溶出量が増加することを確認した。そこで、市販の国内・海外産ミネラルウォーターについても保存期間が長くなるにつれ、溶出量が増加するか検証を行った。国内及び海外製品各 4 試料について、25℃で 6 ヶ月まで保存した結果を図 1-2-

4 に示す。未使用のペットボトルを用いた長期溶出試験と同様に、2-メチル-1,3-ジオキソランは保存期間が長くなるとともに増加し、6 ヶ月後の含有量は国内製品で 0.11~3.4 ng/mL、海外製品で 1.2~2.8 ng/mL となり、2~4 倍にまで増加した。

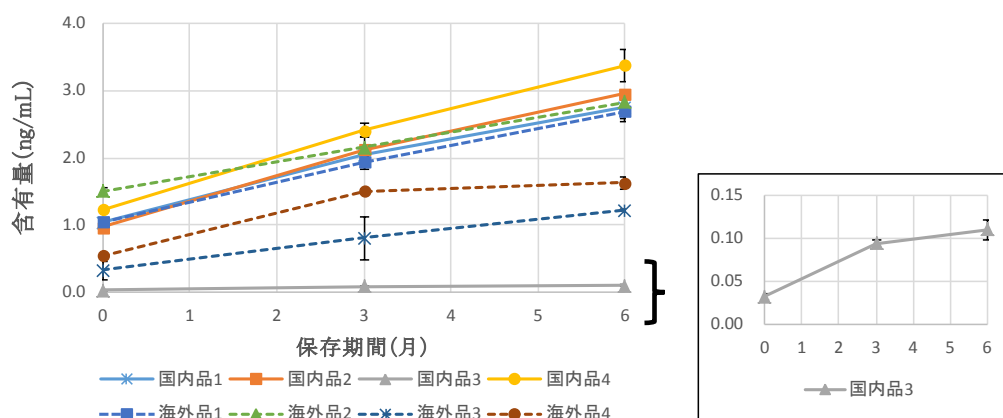


図 1-2-4 市販ミネラルウォーターを室温保管したときの
2-メチル-1,3-ジオキソラン含有量

⑥ まとめ及び考察

ペットボトルから溶出する可能性のある揮発性物質の探索を行うために HS-GC-MS による探索を行い、6 物質を同定した。さらに、これらの食品擬似溶媒への溶出量を定量するために、PT-GC-MS を用いた迅速・簡便で精度の高い一斉分析法を確立した。

未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水もしくは 50%エタノールを充填して溶出試験を行った結果、2-メチル-1,3-ジオキソランが検出された。溶出量は保存温度が高く、保存期間が長くなるほど増加する傾向がみられた。水に比べて 50%エタノールへの溶出量が高く、最大溶出量は水及び 50%エタノールにおいてそれぞれ 1.9 ng/mL 及び 12 ng/mL であった。また、耐熱・耐熱圧ボトルに比べて、非耐熱ボトルで高い溶出量を示し、非耐熱ボトルの材質含有量が高いことが推測された。

国内及び海外の市販ミネラルウォーターの実態調査を実施した結果、未使用のペットボトルと同様に 2-メチル-1,3-ジオキソランが検出され、保存期間が長くなるほど溶出量が増加することを確認した。海外製品においてノナナールが検出されたが、一部の製品に限られており、2-メチル-1,3-ジオキソランがペットボトルから溶出する揮発性物質の主要な物質であることが確認された。

(2) 高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析 (静岡 基博 (地方独立行政法人大阪産業技術研究所))

ペットボトルには、添加剤の他に重合反応における低分子のオリゴマーが含有されている。重合反応における生成物は、使用されるモノマーや開始剤等の組み合わせにより変化するため、多種多様な構造を有する。どのような成分が溶出するかについての詳細な調査は限られており、溶出成分の解明はペットボトルの安全性評価上の大きな課題となっている。質量分析法はポリマーの構造解析にも多く用いられる手法であり、今回この手法を溶出液に含まれる成分の解明に用いる。分析機器は、溶液中の低分子の分析に適したLC-MSを用いる。本研究項目では、多段階フラグメンテーションによってフラグメントイオンの精密質量を得ることができるイオントラップ飛行時間 (IT-TOF) 型の質量分析計を用いる。得られた精密質量と解析ソフトウェアを用い、ペットボトルから溶出する可能性のある成分の構造解析を行う。

(研究成果)

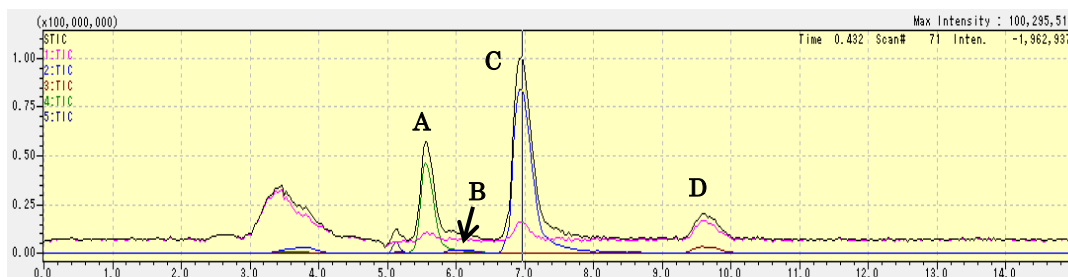
① IT-TOF 型 LC-MS を用いたペットボトル溶出成分の構造解析

ペットボトルから食品擬似溶媒に溶出する可能性が高い化学物質、すなわち極性が高い化学物質を探索・同定するため、ペットボトルの材質からの抽出方法及び LC-MS 分析条件の検討を行った。まず、ペットボトル抽出方法は、ヘキサフルオロイソプロパノールを用いた溶解法とアセトニトリルもしくはジクロロメタンを用いた抽出法を比較し、ピークが最も多く検出されたジクロロメタン抽出法を採用した。LC-MS 分析条件については、逆相カラムである ODS カラムを用いてペットボトルの抽出液を分析した結果、比較的極性が低い環状オリゴマー (3~7 量体) が感度も強くクロマトグラムのピーク形状も良好なイオンとして検出された。一方で、高極性化合物の保持は弱く、早い保持時間帯に非常に多くの物質が共溶出して精密質量を持ってしても複雑に重なり合ったマススペクトルを解析することは困難であった。次に、親水性相互作用クロマトグラフィーである HILIC カラム (移動相: 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液、アセトニトリル、5:95) を使用したところ、逆相カラムでは保持されなかった高極性物質が十分に保持され良好に分離・検出することができた。そのため、本 LC 条件による分析を行い高極性物質のマススペクトル解析を行った。

IT-TOF 型の質量分析計を用いた測定では、抽出物から検出されたイオンに対し、多段階の衝突有機解離 (CID) を行い、構造解析を行った。多段階の CID を行うと多くのイオンから $C_7H_5O_2$ に対応する m/z 121.031 のフラグメントイオンが見られ、ベンゼン環にカルボキシ基が付加した構造が存在することが考えられた。また、 CO_2 、 C_2H_4O に対応する m/z 43.990 や 44.026 といった質量間隔で現れるイオンが検出された。これらの情報から、マススペクトルで観測された成分のうち、ピーク C 及びピーク D は 4-{[2-(4-[2-Hydroxyethoxy]carbonyl)benzoyl]oxy}ethoxy}carbonyl]benzoic acid (HECBOECB acid) や 4-{[2-(2-Hydroxyethoxy)carbonyl]benzoic acid (HECB acid) 等の構造であることが推定された (図2-1)。さらに、これらと m/z で 44.026 大きな質量を持つ物質によるピーク A は 4-{[2-(4-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]carbonyl)benzoyl]oxy}ethoxy}carbonyl]benzoic acid (HEECBOECB acid) であることが推定された。ピーク B については

4-[(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]carbonyl}benzoic acid (HEECB acid)であることが推定された。ピーク A~D について、それぞれカスタム合成した標準試薬と比較した結果、推定化学物質と一致し、ペットボトル溶出成分の構造解析に成功した(図2-2)。末端がカルボキシ基であるオリゴマーの報告例はなく、新たな知見であった。

(i) マスクロマトグラム



(ii) ピーク C のマススペクトル

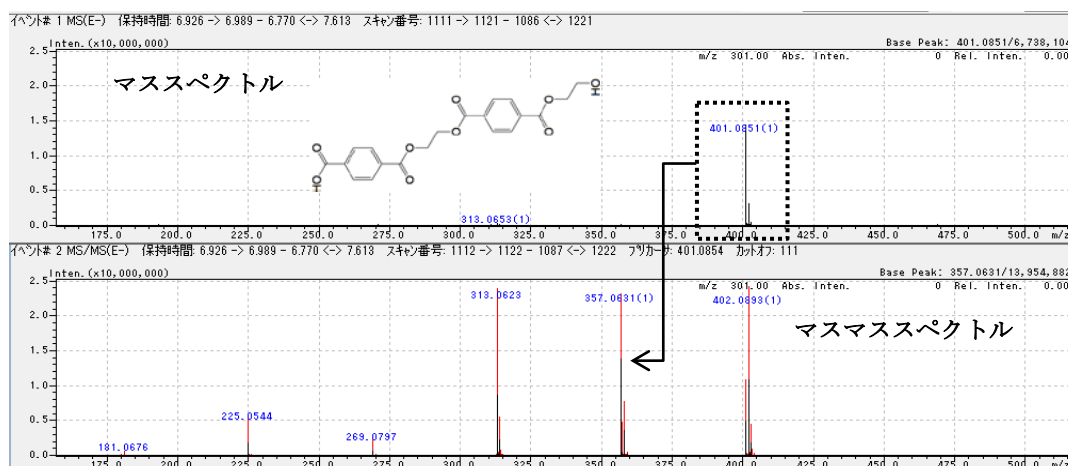


図 2-1 ペットボトル抽出液の LCMS-IT-TOF による

(i) マスクロマトグラム及び (ii) ピーク C のマス及びマスマススペクトル
(上段：マススペクトル；下段： m/z 401.0851 のマスマススペクトル)

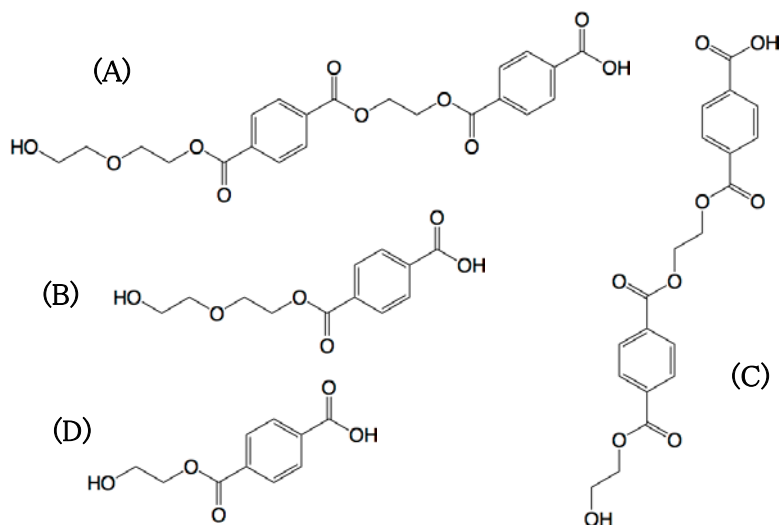


図 2-2 IT-TOF 型 LC-MS により同定したペットボトル成分
(A) HEECBOECB acid, (B) HEECB acid, (C) HECBOECB acid, (D) HECB acid

② DART-MS を用いたペットボトル溶出成分の構造解析

①IT-TOF 型 LC-MS に加え、抽出操作をせずに直接イオン化できる DART (Direct Analysis in the Real Time)-MS を用いてペットボトル溶出成分の同定を試みた。DART-MS は抽出などの前処理をすることなく試料表面の揮発成分を分析することができるため、プラスチックの添加剤分析等に用いられるアンビエント MS の一種である。今回、未使用のペットボトル 16 試料の内面及び外面を DART-MS で分析した。

ペットボトル試料は、1×2 cm にカットして折り曲げ、その折り曲げ部分をピンセットで装置にかざして測定した (写真 2-1)。

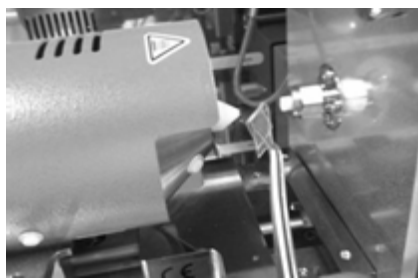


写真 2-1 DART-MS によるペットボトルの測定

その結果、負モードではイオンは観測できず、正モードのみイオンを観測することができた。ペットボトルの内面及び外面で検出されるピークの m/z の差異はほとんど見られなかった。シグナルの相対強度は内面と外面で大きく異なるものも見受けられた。測定を行ったすべての容器で m/z 282.275, m/z 429.115, m/z 446.141, m/z 537.535, m/z 563.548, m/z 591.580 のシグナルが検出された (図 2-3)。一部、 m/z 577.133 及び m/z 595.156 が検出された。

これらの中で m/z 282.275 は $C_{18}H_{36}NO$ でオレイン酸アミドと推定された。 m/z 537.535, 563.548, 591.580 それぞれを前駆イオンとしての CID ですべて 282.275 が生

成イオンとして得られることから、オレイン酸と高級アルコールとのエステル類であると推定された。脂肪酸アミドやエステルはプラスチック類の加工で使用される一般的な添加剤である。

一方、 m/z 429.115 及び m/z 446.141 に対応するイオンは直鎖状のオリゴマー（図 2-3 : A）由来であると推定された。CID の結果もこれを支持した。 m/z 595.156 も直鎖状のオリゴマー（図 2-3 : B）、 m/z 577.133 は環状オリゴマー（図 2-4 : C）由来であると推定された。

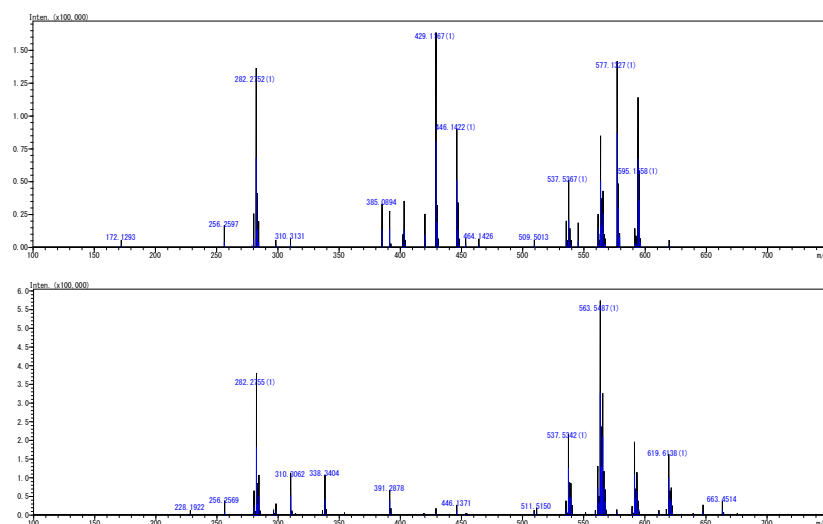


図2-3 マススペクトル (DART, 正モード) 試料：ボトルB
上段：ペットボトル内側、下段：ペットボトル外面

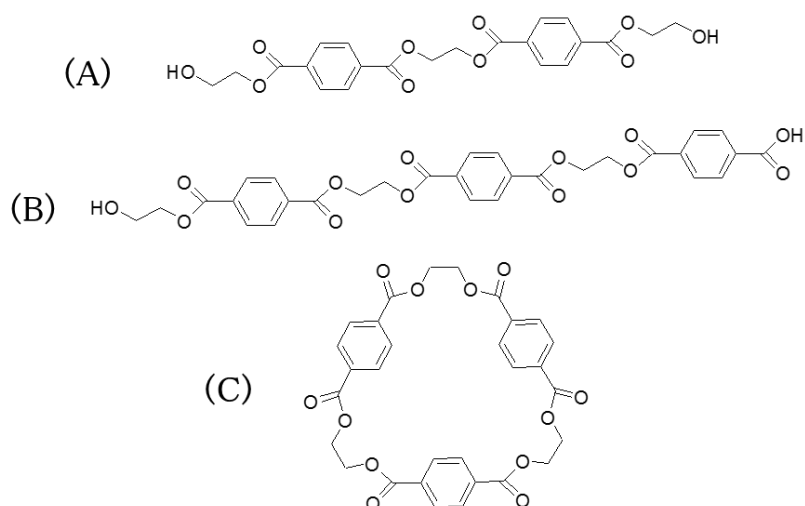


図 2-4 DART-MS により推定したペットボトル成分

③ 同位体標準ラベル化標準物質の合成

個別課題（３）で実施する定量分析をより精度の高いものにするため、HECB acidを重水素でラベル化した標準物質（HECB acid-*d4*）の合成を行った。すべての反応は非標識体で予備合成して反応条件を最適化した。当初予定していた合成スキームではHECB acid-*d4*以外の生成物が主として得られることが明らかになったため、合成方法を新たに模索し、最終的にジエステルを経由する合成経路によりHECB acid-*d4*の合成に成功した（図2-5）。生成物はMS及びNMRにより確認を行った。詳細な合成手順（i～v）を以下に記述する。

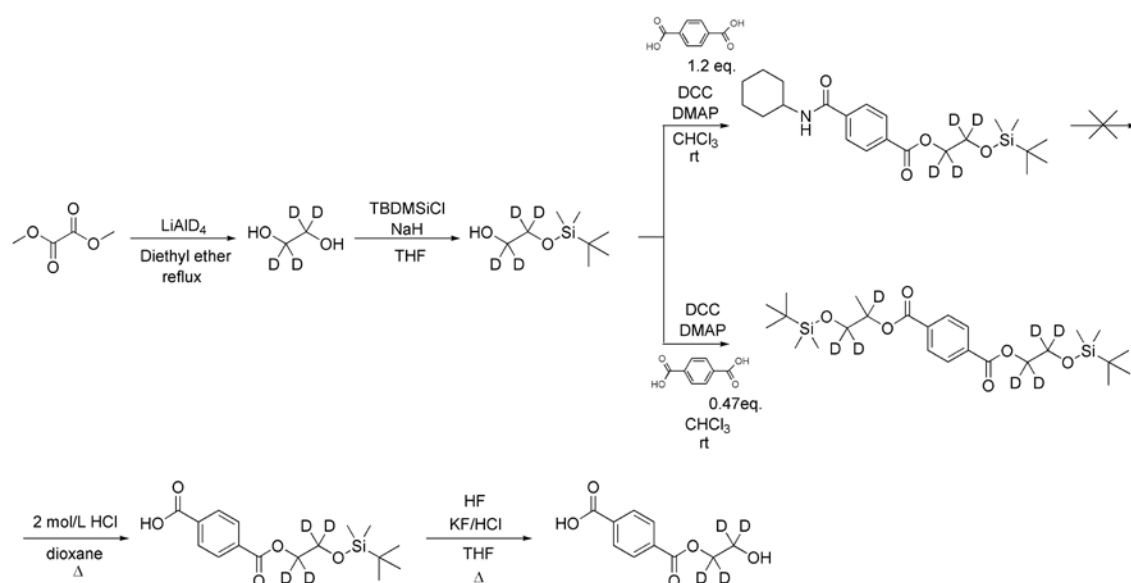


図2-5 同位体標識内部標準（HECB acid-*d4*）の合成スキーム

i) シュウ酸ジメチルの還元

アルゴン気流下、金属ナトリウムから乾燥、蒸留したジエチルエーテルにシュウ酸ジメチル（1.57 g, 13.3 mmol）を溶解し、溶液を0℃に氷冷後、数回に分けて0.10 mol/Lの重水素化アルミニウムリチウムテトラヒドロフラン（THF）溶液（20 mL, 20 mmol）をシリンジを通じて滴下し、発熱が無くなるのを確認した後、還流を行った。重水素ガスの発生が無くなった後、薄層クロマトグラフ（TLC）（シリカゲル60，酢酸エチル/ノルマルヘキサン = 1:1（v/v））で原料の消失を確認した。反応混合物を室温まで冷却した後、湿ったTHFを加えて反応を停止後、2.0 mLの10%水酸化ナトリウム水溶液を加えた。反応混合液をジエチルエーテルで連続抽出器を用いて一昼夜抽出操作を行い、目的物を精製した。溶媒を留去した後、真空乾燥を行い無色の液体として目的物を得た（収率 850 mg, 97%）。¹³C-NMR（150 MHz, D₂O）δ 63.1（qw）；DARTMS *m/z* 67 [M + H]⁺（M: C₂H₂D₄O₂）。

ii) 重水素化エチレングリコールのモノシリル保護

アルゴン雰囲気下、金属ナトリウムから蒸留した直後のTHF 100 mLに重水素化エチレングリコール (850 mg, 12.9 mmol) を溶解した。5℃まで氷浴で冷却後、水素化ナトリウム (ca. 60% 鉱油分散物) (530 mg, ca. 13 mmol) を加えて30分撹拌した。室温でさらに1時間撹拌後、再び冷却して塩化ターシャリーブチルジメチルケイ素 (1.35 g, 8.96 mmol) を加えて30分間撹拌した。室温までゆっくり昇温した後、反応混合溶液を撹拌した。4時間で原料の消失及び目的物の生成をTLC (シリカゲル60, 酢酸エチル/ノルマルヘキサン = 1:4 (v/v)) で確認したため、反応溶液を氷冷し、メタノールを加えて反応停止した。反応混合物を濃縮後、クロロホルムを加えて、有機層を数回水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ取後、溶媒を留去し、残渣を中圧液体クロマトグラフ (中性シリカゲル)、酢酸エチル/ノルマルヘキサン = 1:4 (v/v)) で分取した。得られた画分に含まれる試料をノルマルヘキサン/ジエチルエーテルから再結晶して目的物を得た (1.08 g, 67 %). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 0.08 (s, 6H), 0.91 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ -5.4, 18.3, 25.8, 62.8 (qw), 63.3 (qw); DARTMS m/z 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (M: $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{D}_4\text{O}_2\text{Si}$).

iii) モノシリル保護標識エチレングリコールのエステル化

得られたモノシリル保護体をさまざまな縮合剤を使用してエステル化反応を行ったが、モノエステル化を企ててテレフタル酸の投薬量を増やした場合、残りのカルボキシル基は縮合剤からの副生成物の尿素誘導体と反応してアミド化することがわかった。カルボジイミド型の縮合剤ではすべて同様の結果となった。

そこで、ジエステルを合成してその一方だけを加水分解することで合成する別ルートで合成を進めることとした。アルゴン気流下、乾燥ジクロロメタン30 mLにモノシリル保護標識エチレングリコール (454 mg, 2.52 mmol) とテレフタル酸 (197 mg, 1.19 mmol) を溶解して0℃まで氷冷した。ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (545 mg, 2.65 mmol) を加えて分散させた。反応混合物に4-*N,N*-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (323 mg, 2.65 mmol) を加えて30分間撹拌した。その後、ゆっくりと室温まで反応混合物の温度を昇温させて、8時間反応した。TLC (シリカゲル60, 酢酸エチル/ノルマルヘキサン = 1:4 (v/v)) で目的物の生成とテレフタル酸の消失を確認した後、メタノールを加えて反応を停止した。そのまま、中性シリカゲルに吸着させてカラムに充填後、中圧液体クロマトグラフ (中性シリカゲル)、酢酸エチル/ノルマルヘキサン = 1:4 (v/v)) で目的物を分取した。目的物を加熱ノルマルヘキサンから再結晶し、無色の針状結晶を得た (450 mg, 75%)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 0.08 (s, 12H), 0.90 (s, 18H), 8.12 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ -5.3, 18.3, 25.8, 62.8 (qw), 63.3 (qw), 129.6, 134.0, 165.8; DARTMS m/z 504 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (M: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{D}_8\text{O}_6\text{Si}_2$).

iv) ジエステルのアルカリ加水分解によるモノエステル化

ジエステル (432 mg, 0.857 mmol) をジオキサン20 mLに溶解し、その溶液に50%水酸化カリウム水溶液 5 mLを加えて80℃に加熱した。30分毎にTLC (シリカゲル60, 酢酸エチル/ノルマルヘキサン/メタノール = 5:5:1 (v/v/v)) で確認し、およそ5時間で反応を停止した。反応混合液に氷を加えたのちにジエチルエーテルを加えた。ジエチルエーテル層

を冷水で数回洗浄した。水槽を合わせて冷却した後、クロロホルムを加えて加熱しないように約1 mol/Lの希塩酸を加えてpH 1とした。数回クロロホルムで抽出した後、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを留去し残渣を中圧液体クロマトグラフ（シリカゲル60, 酢酸エチル/ノルマルヘキサン/メタノール = 5:5:1 (v/v/v)）で精製して目的物を得た（135 mg, 48%）。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 0.09 (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 8.16 (d, 2H, ³J = 6 Hz), 8.18 (d, 2H, ³J = 6 Hz); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ -5.4, 18.3, 25.8, 60.5 (qw), 66.0 (qw), 129.7, 130.2, 133.0, 134.8, 165.7, 170.8; DARTMS *m/z* 327 [M - H]⁻ (M: C₁₆H₂₀D₄O₅Si).

v) シリル保護基の脱保護

マイルドな条件で脱保護が可能なフッ化テトラノルマルブチルアンモニウムによる脱保護を試みたが、トルエン還流条件で96時間かけても脱保護が進まなかった。そこでフッ酸を用いて脱保護を試みたが反応が遅く、フッ化カリウムと濃塩酸とを加えて系中でフッ化水素を発生させたところ、7時間で脱保護を行うことができた。

ポリエチレンの反応容器にシリル保護モノエステル（128 mg, 0.391 mmol）を入れて5 mLのTHFに溶解し、フッ化カリウム（115 mg, 1.95 mmol）と濃塩酸（0.250 mL, 3.00 mmol）とを加えて密栓し、45℃に保ちながら攪拌した。1時間ごとにTLCで追跡し、7時間で原料の消失と目的物の生成を確認した。反応混合液にジエチルエーテル10 mLを加えたのちにあらかじめ冷却した飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 10 mLを加えた。ジエチルエーテル層を冷水で数回洗浄した。水槽を合わせて冷却した後、クロロホルム10 mLを加えて加熱しないように約6 mol/Lの希塩酸を加えてpH 1とした。数回クロロホルムで抽出した後、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを留去し残渣を中圧液体クロマトグラフ（シリカゲル60, 酢酸エチル/ノルマルヘキサン/メタノール = 5:5:1 (v/v/v)）で精製して目的物を得た（36 mg, 43%）。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (m, 4H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 63.5 (qw), 66.0 (qw), 129.5, 130.1, 133.1, 134.7, 165.6, 170.9; DARTMS *m/z* 213 [M - H]⁻ (M: C₁₀H₆D₄O₅).

以上の手順により合成に成功したHECB acid-*d4*の¹H-NMRを図2-6に、マスペクトルを図2-7に示した。

④ まとめ及び考察

ペットボトルから溶出する可能性のある未知物質の同定を行うために IT-TOF 型 LC-MS 及び DART-MS による探索を行い、末端がカルボキシ基であるオリゴマーを含め、これまで報告例のない新たな物質を同定することができた。

また、個別課題（3）で実施する定量分析をより精度の高いものにするため、同位体標準ラベル化標準物質の合成を行い、MS 及び NMR により確認した。

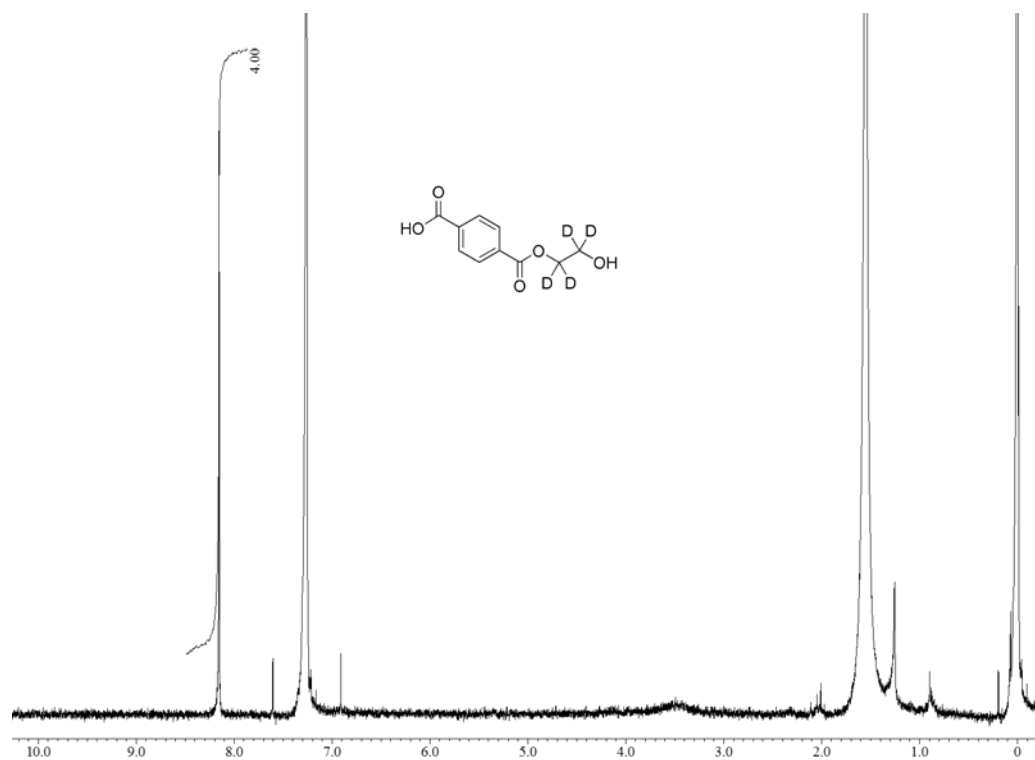


図2-6 HECB acid-*d*₄の¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) スペクトル

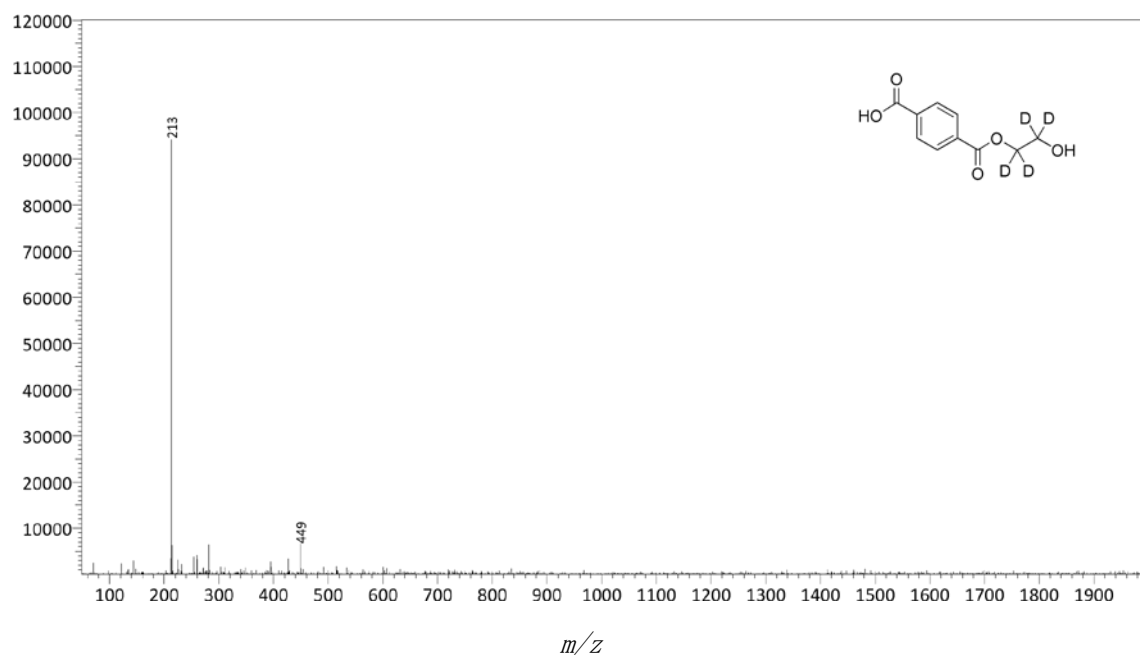


図2-7 HECB acid-*d*₄のDARTMSスペクトル (DART heater temp.: 400°C)

(3) ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量(山本 敦史(公立大学法人公立鳥取環境大学))

まずは既知のモノマーや添加剤についての分析法を確立し短期間における溶出試験の溶出液に対しての定量分析を行い、溶出条件の最適化に活用する。それ以外の成分について(2)によって物質が同定され次第、定量分析法を確立する。(2)で用いるIT-TOF型は物質同定には優れているが、定量性に劣ることから、定量性の高いタンデム四重極型のLC-MSを用いる。オリゴマーは標準品が販売されていないと考えられるため、標準品のカスタム合成も検討する。

(研究成果)

① ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量分析法の確立

ペットボトルに含有されるモノマーやオリゴマーの情報を得るため、過去の文献調査を行った。その中で、報告のみられたテレフタル酸、イソフタル酸、ビスヒドロキシエチルテレフタル酸、ジメチルテレフタル酸、環状オリゴマーについて標準品を入手し、ペットボトルのジクロロメタン抽出液にこれらが含有されているかを確認した。その結果、環状オリゴマーは材質中に多く含まれており、2量体から7量体までを検出することができたが、テレフタル酸やイソフタル酸等の含まれる量は少ないと考えられた。

次に、ペットボトルから溶出する可能性のある物質についてLC-MSを用いた分析法の開発を試みた。まず、LC条件を検討した結果、個別課題(2)の①IT-TOF型LC-MSにより同定された4物質(HEECBOECB acid, HECB acid, HECBOECB acid, HEECB acid)とPET樹脂製造時に使用される可能性のある物質であるジエチレングリコール、ブタンジオール、ジメチルテレフタル酸及びビスヒドロキシエチルテレフタル酸をLCカラムにODSカラムを用いることにより、良好に分析することができた(図3-1、表3-1)。一方、環状オリゴマーの感度は良好であるものの、5量体から7量体のオリゴマーはLCカラムへの吸着が非常に強く、一旦吸着してしまったLCカラムからは常に環状オリゴマーのピークが見られる状態になり、定量が困難であった。カラムの種類を変更して検討したが、多くのカラムで同様に強い吸着が見られた。そこで、一般的な球状シリカゲルを修飾した充填剤ではなく、モノリス状のシリカゲルを用いたLCカラムであるMonoclad-ODSカラム(GLサイエンス社製)を用いたところ、環状オリゴマーの吸着は見られず、良好に分析することができた(表3-2)。これより、環状オリゴマーは一般的なLCカラムの固定相の保持に用いられるフリットに吸着すると推測された。

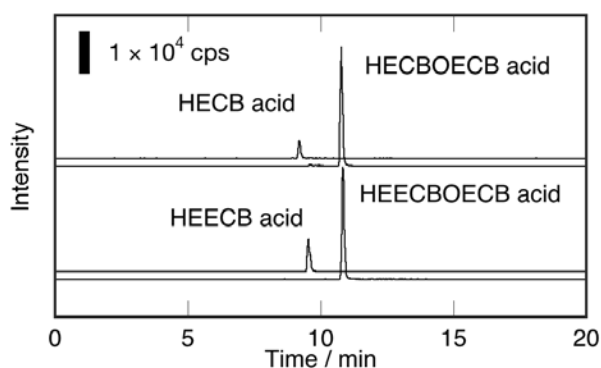


図 3-1 IT-TOF 型 LC-MS により同定された 4 物質の LC-MS クロマトグラム (各 10 ng/mL)

表 3-1 モノマー、オリゴマー類の LC 条件

カラム	TSK-Gel ODS-100S 2 mm × 150 mm
流速	0.2 mL/min
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B	5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント条件	B 5%(0 min) → 5% (3 min) → 100% (8 min) → 100% (18 min) → 5% (18.1 min) → 5% (23 min)
注入量	10 µL
カラムオープン温度	40 °C

表 3-2 環状オリゴマーの LC 条件

カラム	Monoclad ODS 3 mm × 250 mm
流速	0.25 mL/min
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B	5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント条件	B 85%(0 min) → 85% (3 min) → 100% (17 min) → 100% (23 min) → 85% (23.1 min) → 85% (28 min)
注入量	10 µL
カラムオープン温度	40 °C

次に、MS 条件の検討を行うために、個別課題（2）で合成した重水素で標識した HBCD acid- d_4 を含めてそれぞれフラグメントイオンの選択を行い、選択反応モニタリングによる定量分析条件の最適化を行った（表 3-3、表 3-4、表 3-5）。

以上より、PET 樹脂のモノマー類であるジエチレングリコール、ブタンジオール、ジメチルテレフタル酸及びビスヒドロキシエチルテレフタル酸に加え、個別課題（2）で同定した比較的極性の高い末端がカルボキシル基であるオリゴマーについて LC-MS を用いた一斉分析法を開発することができた。また、環状オリゴマーについても、吸着がなく精度よく測定できる分析条件を確立することができた。このように幅広い物性を有する PET 溶出物質の分析法を報告した事例はなく、非常に有用性が高い。

表 3-3 モノマー、オリゴマー類の最適化した MS 条件 (正イオンモード)

物質名	MS1	MS2	Dwell time / sec	DP ¹ / V	CE ² / V
ジエチレングリコール	107.07	89.063	0.06	10	5
	107.07	45.0335	0.06	10	15
ブタンジオール	91.08	73.065	0.06	15	5
	91.08	55.0542	0.06	15	15
ジメチルテレフタル酸	197.0	151.0754	0.06	60	15
	197.074	163.039	0.06	60	20
ビスヒドロキシエチル	255.09	193.0488	0.06	40	15
テレフタル酸	255.09	149.0233	0.06	40	25

¹Declustering potential, ²Collision energy

表 3-4 モノマー、オリゴマー類の最適化した MS 条件 (負イオンモード)

物質名	MS1	MS2	Dwell time / sec	DP ¹ / V	CE ² / V
HECB acid	209.05	121.0295	0.05	-80	-20
	209.05	120.0217	0.05	-80	-20
HECBOECB acid	401.09	313.0718	0.05	-80	-25
	401.09	121.0295	0.05	-80	-40
HEECB acid	253.07	77.0397	0.05	-80	-30
	253.07	121.0295	0.05	-80	-20
HEECBOECB acid	445.12	313.0718	0.05	-80	-25
	445.12	121.0295	0.05	-80	-45
HECB acid- <i>d</i> ₄	213.07	121.0290	0.05	-80	-20
	213.07	169.1210	0.05	-80	-10

¹Declustering potential, ²Collision energy

表 3-5 環状オリゴマーの最適化した MS 条件（正イオンモード）

物質名	MS1	MS2	Dwell time / sec	DP ¹ / V	CE ² / V
環状2量体	402.1	193.0493	0.05	60	45
	402.1	149.0232	0.05	60	60
環状3量体	577.13	193.0500	0.05	70	45
	577.13	149.0234	0.05	70	60
環状4量体	786.20	193.0500	0.05	80	55
	786.20	149.0232	0.05	80	70
環状5量体	978.24	385.0905	0.05	80	65
	978.24	193.0491	0.05	80	75
環状6量体	1170.29	577.1246	0.05	80	60
	1170.29	193.0496	0.05	80	75
環状7量体	1362.33	769.1766	0.05	80	60
	1362.33	193.0497	0.05	80	75

¹Declustering potential, ²Collision energy

② モノマー、オリゴマー類の溶出試験法のバリデーション

①で確立したモノマー類、オリゴマー類の溶出試験法のバリデーションを分析者 1 名、3 試行で 5 日間の枝分かかれ試験により実施した。添加濃度は、定量下限値の 5～10 倍とした。器具・容器包装に関する試験法の妥当性を評価する基準は示されていないため、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（厚生労働省医薬食品局食品安全性部長通知、平成 22 年 12 月 24 日、食安発 1224 第 2 号）に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を求めた。各性能パラメーターの目標値はこのガイドラインを参考に設定した。すなわち、添加濃度が 1 ng/mL 以下の場合、真度は 70～120%、併行精度は 30%未満、室内再現精度は 35%未満とし、添加濃度が 3 ng/mL の場合、真度は 70～120%、併行精度は 25%未満、室内再現精度は 30%未満とし、添加濃度が 100 ng/mL の場合、真度は 70～120%、併行精度は 15%未満、室内再現精度は 20%未満とし、添加濃度が 300 ng/mL の場合、真度は 70～120%、併行精度は 10%未満、室内再現精度は 15%未満とした。その結果を表 3-6 に示す。真度は 95.6～112.0%、併行精度は 3.5～9.7%、室内再現精度は 4.1～12%と良好であり、全て目標値を満たしていた。

表 3-6 モノマー、オリゴマー類の妥当性評価

物質名	定量下限値 (ng/mL)	添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
HECB acid	0.1	1	106.0	5.1	7.3	○
HECBOECB acid	0.02	0.1	95.6	3.5	4.1	○
HEECB acid	0.05	0.3	100.3	5.3	10	○
HEECBOECB acid	0.02	0.1	98.2	5.3	7.7	○
ビスヒドロキシエチルテレフタル酸	0.5	3	97.8	7.2	7.3	○
ジメチルテレフタル酸	20	100	99.3	9.7	12	○
ジエチレングリコール	50	300	96.4	4.8	11	○
ブタンジオール	20	100	112.0	9.6	12	○

(1人×n=3×5日間)

③ 環状オリゴマーの溶出試験法のバリデーション

水、4%酢酸及び50%エタノール溶出液の環状オリゴマーは、50%エタノール溶出液はそのまま、水及び4%酢酸はエタノールを用いて2倍に希釈して50%エタノール溶液とし、①で確立したLC-MS一斉分析法により測定した。なお、環状3量体については、溶出液中で感度よく測定できた594.16のイオン（アンモニア付加体）を用いて定量した。

本法のバリデーションを分析者1名、3試行で5日間の枝分かかれ試験により実施した。添加濃度は、定量下限値の5～10倍とした。器具・容器包装に関する試験法の妥当性を評価する基準は示されていないため、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（厚生労働省医薬食品局食品安全性部長通知、平成22年12月24日、食安発1224第2号）に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を求めた。各性能パラメーターの目標値はこのガイドラインを参考に、真度は70～120%、併行精度は15%未満、室内再現精度は20%未満とした。その結果を表3-7に示す。環状3量体から6量体の真度は100.5～109.8%、併行精度は4.0～10.2%、室内再現精度は4.6～12.5%と良好であり、全て目標値を満たしていた。なお、環状7量体は極性が低く、水やエタノール等の極性溶媒中では不安定であり、良好な真度及び精度が得られなかった。そのため、環状7量体については定量項目から除外し、検出された場合は定性のみ実施した。

表 3-7 環状オリゴマーの妥当性評価

	定量下限値 (ng/mL)	添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
環状2量体	5	50	109.8	7.6	7.6	○
環状3量体	5	50	107.2	4.1	4.6	○
環状4量体	5	50	100.5	4.0	4.6	○
環状5量体	5	50	103.5	5.8	6.9	○
環状6量体	10	50	107.0	10.2	12.5	○

(1人×n=3×5日間)

④ 未使用のペットボトルを用いたモノマー、オリゴマー類の短期間溶出試験（10日間、25、40、60℃）

確立した試験法を用い、16 試料のうち、耐熱・耐熱圧ボトル 4 試料及び非耐熱ボトル 4 種類の計 8 種類について短期間の溶出試験を実施した。それぞれのペットボトルに食品擬似溶媒として水、4% 酢酸もしくは 50% エタノールを充填し 25、40、60℃ で 10 日間保存し、溶出成分を測定した。ただし、60℃ は耐熱・耐熱圧ボトルを対象とし、水及び 4% 酢酸溶出液のみ実施した。

その結果、いずれの食品擬似溶媒においても、HECB acid 及び HECBOECB acid はボトル E を除く多くのボトルから検出され、保存温度が高くなるほど溶出量は増加した（表 3-8、表 3-9、表 3-10、表 3-11、表 3-12、表 3-13）。食品擬似溶媒で比較すると、HECB acid 及び HECBOECB acid のいずれにおいても 50%エタノールへの溶出量が最も高かった。水と 4%酢酸を比較すると、HECB acid はほぼ同等であったが、HECBOECB acid は水に比べて 4%酢酸への溶出量がやや高い傾向がみられた。また、ビスヒドロキシエチルテレフタル酸は 25℃では検出されなかったが、40℃ではボトル E を除き 50%エタノール溶出液において検出され、溶出量は 0.5 ng/mL 未満～1.6 ng/mL であった。

表 3-8 短期間溶出試験（水溶出液）における HECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)		
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間	60℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	ND	0.57 ± 0.08	1.7 ± 0.2
C	耐熱ボトル	0.21 ± 0.08	0.41 ± 0.09	1.7 ± 0.2
E	耐熱ボトル	ND	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	ND	0.48 ± 0.02	2.6 ± 0.7
G	耐圧ボトル	0.11 ± 0.06	0.46 ± 0.10	-
L	無菌充填用ボトル	ND	0.39 ± 0.10	-
N	無菌充填用ボトル	0.26 ± 0.06	0.52 ± 0.10	-
P	無菌充填用ボトル	0.18 ± 0.04	0.43 ± 0.10	-

ND < 0.1 ng/mL, 平均値±SD, n = 3, -:実施せず

表 3-9 短期間溶出試験（4%酢酸溶出液）における HECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)		
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間	60℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	ND	0.48 ± 0.08	2.4 ± 0.2
C	耐熱ボトル	ND	0.34 ± 0.10	1.6 ± 0.1
E	耐熱ボトル	ND	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	ND	0.37 ± 0.10	2.5 ± 0.4
G	耐圧ボトル	ND	0.43 ± 0.10	-
L	無菌充填用ボトル	ND	0.24 ± 0.10	-
N	無菌充填用ボトル	0.11 ± 0.06	0.34 ± 0.06	-
P	無菌充填用ボトル	ND	0.25 ± 0.04	-

ND < 0.1 ng/mL, 平均値±SD, n = 3, -:実施せず

表 3-10 短期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における HECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)	
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	0.33 ± 0.05	1.5 ± 0.1
C	耐熱ボトル	0.31 ± 0.10	0.79 ± 0.14
E	耐熱ボトル	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	0.31 ± 0.08	1.0 ± 0.2
G	耐圧ボトル	ND	1.6 ± 0.2
L	無菌充填用ボトル	0.24 ± 0.06	1.0 ± 0.2
N	無菌充填用ボトル	0.25 ± 0.10	1.8 ± 0.2
P	無菌充填用ボトル	0.22 ± 0.10	1.2 ± 0.2

ND < 0.1 ng/mL, 平均値±SD, n = 3

表 3-11 短期間溶出試験（水溶出液）における HECB0ECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)		
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間	60℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	ND	ND	0.24 ± 0.03
C	耐熱ボトル	ND	ND	0.18 ± 0.03
E	耐熱ボトル	ND	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	ND	ND	0.59 ± 0.11
G	耐圧ボトル	ND	ND	-
L	無菌充填用ボトル	ND	ND	-
N	無菌充填用ボトル	ND	ND	-
P	無菌充填用ボトル	ND	ND	-

ND < 0.02 ng/mL, 平均値±SD, n = 3, -:実施せず

表 3-12 短期間溶出試験（4%酢酸溶出液）における HECBOECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)		
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間	60℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.29 ± 0.02
C	耐熱ボトル	ND	0.04 ± 0.01	0.16 ± 0.06
E	耐熱ボトル	ND	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.71 ± 0.07
G	耐圧ボトル	ND	0.08 ± 0.02	-
L	無菌充填用ボトル	ND	0.06 ± 0.02	-
N	無菌充填用ボトル	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01	-
P	無菌充填用ボトル	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	-

ND < 0.02 ng/mL, 平均値±SD, n = 3

表 3-13 短期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における HECBOECB acid 溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)	
		25℃ 10 日間	40℃ 10 日間
B	耐熱ボトル	0.12 ± 0.02	0.38 ± 0.06
C	耐熱ボトル	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.02
E	耐熱ボトル	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	0.11 ± 0.01	0.52 ± 0.04
G	耐圧ボトル	0.17 ± 0.02	1.1 ± 0.1
L	無菌充填用ボトル	0.09 ± 0.01	0.81 ± 0.08
N	無菌充填用ボトル	0.15 ± 0.05	1.2 ± 0.1
P	無菌充填用ボトル	0.14 ± 0.02	1.1 ± 0.1

ND < 0.02 ng/mL, 平均値±SD, n = 3

⑤ 未使用のペットボトルを用いたモノマー、オリゴマー類の長期間溶出試験（10 日間～12 ヶ月、25℃）

④と同様の未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは 50 %エタノールを充填し、25℃で 10 日、3、6、9、12 ヶ月間保存し、溶出成分を測定した。その結果、短期間溶出試験と同様 HECB acid 等が検出された（図 3-2）。水溶出液において、12 ヶ月後の溶出液すべてから HECB acid が検出された。ボトル E では 12 ヶ月経過後に急激に溶出量が増加した。その他のボトルの溶出量は 0.25～0.64 ng/mL であった（図 3-3）。4%酢酸及び 50% エタノールにおいても同様の傾向がみられた。12 ヶ月後の溶出量は 50% エタノールにおいて 0.95～2.0 ng/mL であり、ボトル E を除き、水に比べるとやや高い値であった（図 3-4、図 3-5）。

50% エタノール溶出液では HECBOECB acid やビスヒドロキシエチルテレフタル酸も同様な傾向で検出された。12 ヶ月後の溶出量は それぞれ 0.16～1.6 ng/mL 及び 0.4～1.7 ng/mL であった。耐熱・耐熱圧ボトルと非耐熱ボトルの溶出量に大きな差及び傾向は見ら

れなかった。

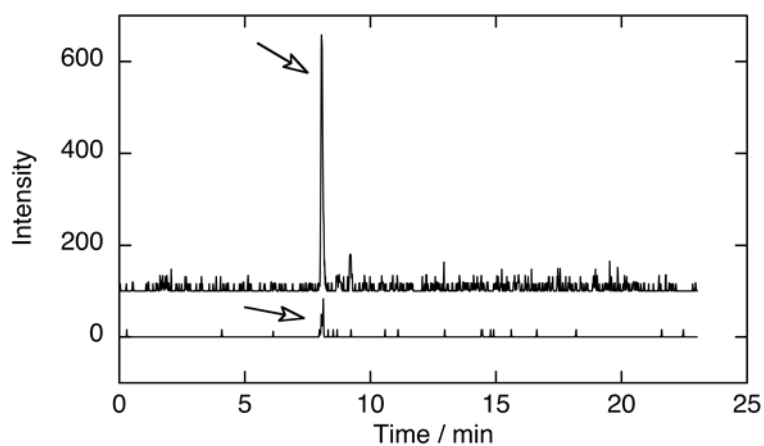


図 3-2 長期間溶出液（ボトル B）分析時の HECB acid クロマトグラム
上： m/z 209.05 $\rightarrow$ 121.0295 のトランジション
下： m/z 209.05 $\rightarrow$ 120.0217 のトランジション

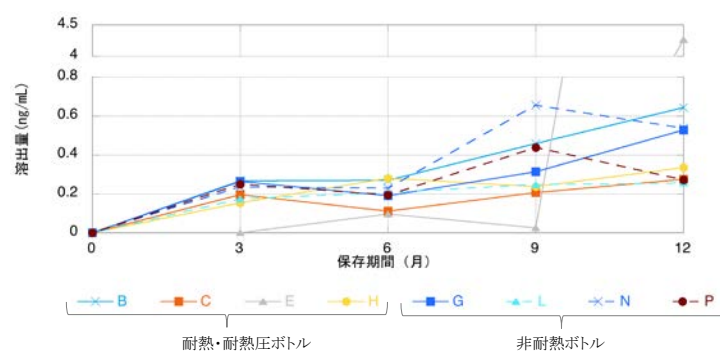


図 3-3 長期間溶出試験（水溶出液）における HECB acid 溶出量

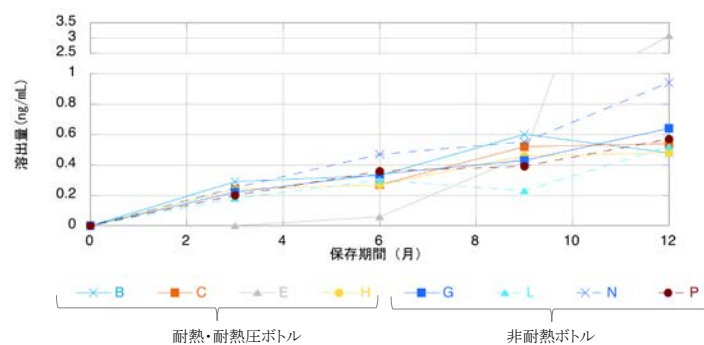


図 3-4 長期間溶出試験（4%酢酸溶出液）における HECB acid 溶出量

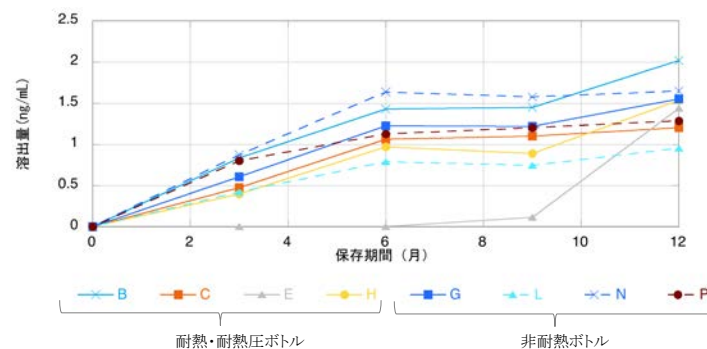


図 3-5 長期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における HECB acid 溶出量

⑥ 未使用のペットボトルを用いた環状オリゴマーの短期間溶出試験（10 日間、25、40、60℃）

④と同様の未使用のペットボトル8試料に食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは50%エタノールを充填し、25、40、60℃で10日間保存し、環状オリゴマーを測定した。ただし、60℃は耐熱・耐熱圧ボトルを対象とし、水及び4%酢酸溶出液のみ実施した。その結果、50%エタノール溶出液において環状3量体が検出された（表3-12）。

水及び4%酢酸溶出液においては、いずれの環状オリゴマーも検出されなかった。一方、50%エタノール溶出液では、環状3量体のみ検出され、25℃では8試料中6試料より7.7～15.2 ng/mL 溶出した。40℃の溶出試験ではボトル E 以外の全てのボトルで15.7～50.0 ng/mL の溶出が認められた。溶出量は25℃から40℃に上げると3～5倍となり、保存温度が高いほど溶出量は高くなった。

表3-12 短期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における環状3量体の溶出量

試料	ボトル分類	溶出量 (ng/mL)	
		25℃10日	40℃10日
B	耐熱ボトル	7.7 ± 0.2	35.3 ± 0.3
C	耐熱ボトル	ND	15.7 ± 0.8
E	耐熱ボトル	ND	ND
H	耐熱圧ボトル	9.9 ± 0.7	28.1 ± 1.2
G	耐圧ボトル	15.2 ± 0.7	50.0 ± 0.8
L	無菌充填用ボトル	11.5 ± 0.6	36.1 ± 2.8
N	無菌充填用ボトル	13.4 ± 0.6	40.7 ± 3.4
P	無菌充填用ボトル	14.5 ± 0.1	45.3 ± 1.4

ND < 5 ng/mL, 平均値±SD, n=3

⑦ 未使用のペットボトルを用いた環状オリゴマーの長期間溶出試験（10 日間～12 ヶ月、25℃）

④と同様の未使用のペットボトル8試料に食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは50%エタノールを充填し、25℃で10日、3、6、9、12ヶ月間保存し、環状オリゴマーを測定した。その結果、短期間溶出試験と同様に、環状3量体のみが検出された（図3-6）。

水及び4%酢酸溶出液では、12ヶ月後までいずれの環状オリゴマーも検出されなかった。一方、50%エタノール溶出液では、ボトル E を除くすべてのボトルで10日後から溶出し始め、保存期間が長くなるほど溶出量は増加し、12ヶ月後の溶出量は13.4～26.3 ng/mL であった。耐熱・耐熱圧ボトルと非耐熱ボトルの溶出量に大きな差及び傾向は見ら

れなかった。

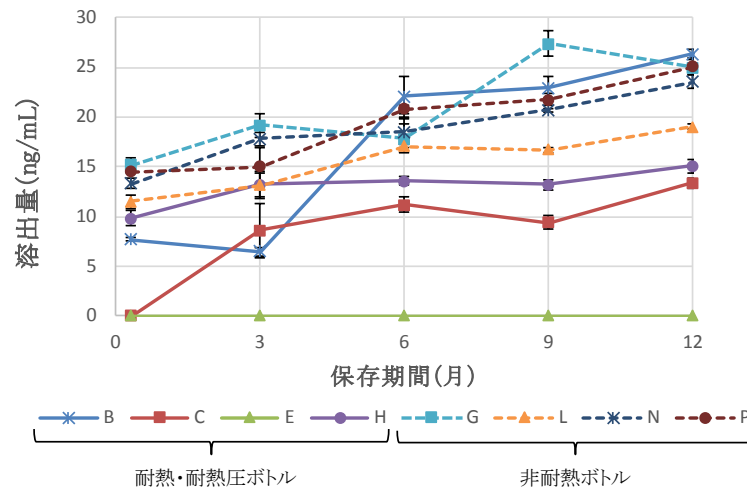


図 3-6 長期間溶出試験（50%エタノール溶出液）における環状 3 量体の溶出量

▲ ボトル E : ND < 5ng/mL

⑧ まとめ及び考察

ペットボトルから溶出する可能性のあるモノマー類及び個別課題（2）において同定された 4 物質の計 8 物質について LC-MS を用いた一斉分析法を開発した。また、ペットボトル材質中に多く含まれる環状オリゴマー（3～6 量体）についても吸着がなく精度よく測定できる分析法を確立した。

未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水、4%酢酸もしくは 50%エタノールを充填して溶出試験を行った結果、個別課題（2）で同定した HECB acid や HECBOECB acid 等が検出された。溶出量は保存温度が高く、保存期間が長くなるほど増加する傾向がみられた。水や 4%酢酸に比べて 50%エタノールへの溶出量が高く、HECB acid 及び HECBOECB acid の最大溶出量は水溶出液においてそれぞれ 4.2 ng/mL 及び 0.02 ng/mL 未満、4%酢酸溶出液においてそれぞれ 3.1 ng/mL 及び 1.3 ng/mL、50%エタノールにおいてそれぞれ 2.0 ng/mL 及び 1.6 ng/mL であった。また、環状オリゴマーのうち、材質含有量が最も多いことが報告されている 3 量体が 50%エタノール溶出液において検出された。溶出量は保存温度が高く、保存期間が長くなるほど増加する傾向がみられ、最大溶出量は 50 ng/mL であった。

(4) ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量(平成28年度:阿部 裕、平成29年度:六鹿 元雄、(国立医薬品食品衛生研究所))

ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド(AA)及びホルムアルデヒド(FA)の定量を行う。AAはPETを溶解して成形する際にポリマーの熱分解により、また、FAもPETの加熱により生成する。これまでに分担研究者のグループではペットボトル中及びペットボトルから溶出するAA及びFAを誘導体化したのち紫外吸収検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-UV)もしくはLC-MSで測定する方法を報告している(日食化誌, 10, 2003; Food Addit. Cont., 22, 2005; Food Addit. Cont., 23, 2006)。そこで今回、より高感度かつ高精度な分析法を検討し、既存の分析法との検出感度を比較する。最も高感度な分析法を用いてペットボトル溶出液中のAA及びFAの定量を行う。

(研究成果)

① AA 及び FA の分析法の確立

AA 及び FA の高感度分析法として、日本の水道法で用いられている 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)誘導体化法を選択し、バイアル中で誘導体化を行い、そのまま LC-MS/MS で測定する簡易な分析法へと改良した。改良した分析法について、蒸留水及び硬度や pH が異なる 10 種類の市販ミネラルウォーターを用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 82~105%、相対標準偏差は 1~9%であり、過去に我々が報告した分析法と比べて同等以上の精度で AA 及び FA を分析できることを確認した。さらに定量下限については、過去の分析法のおよそ 1/5 まで低減させることができ、より高感度な測定が可能となった。本法は迅速かつ簡便だけでなく、従来よりも試薬類、ガラス器具類の使用を抑えることができ、試験者のみならず環境への負荷も低減可能であったことから、非常に有用であると考えられた。

さらに本法のバリデーションを実施した。添加濃度を 5、20 及び 50 ng/mL とし、分析者 2 名、2 試行で 3 日間の枝分かれ試験により実施した。器具・容器包装に関する試験法の妥当性を評価する基準は示されていないため、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(厚生労働省医薬食品局食品安全性部長通知、平成 22 年 12 月 24 日、食安発 1224 第 2 号)に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度及び室内再現精度を求めた。各性能パラメーターの目標値はこのガイドラインを参考に設定した。すなわち、添加濃度が 5 ng/mL の場合、真度は 70~120%、併行精度は 25%未満、室内再現精度は 30%未満とし、添加濃度が 20 及び 50 ng/mL の場合、真度は 70~120%、併行精度は 15%未満、室内再現精度は 20%未満とした。その結果を表 4-1 に示した。真度は 97.8~99.9%、併行精度は 1.4~7.4%、室内再現精度は 3.5~7.6%であり、すべての性能パラメーターが目標値を満たしていた。以上より、本法は迅速かつ高感度だけでなく、高精度であることを確認した。

表 4-1 ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド分析法の妥当性評価

	添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
ホルムアルデヒド (FA)	5	99.9	3.9	5.1	○
	20	99.6	1.4	3.5	○
	50	99.5	2.6	4.8	○
アセトアルデヒド (AA)	5	97.8	7.4	7.6	○
	20	98.9	2.5	4.5	○
	50	99.9	2.1	4.2	○

(2人×n=2×3日間)

② 未使用のペットボトルを用いた短期間溶出試験 (10 日間、25、40、60℃)

未使用のペットボトル 8 試料について、食品擬似溶媒として水を用い、短期間の溶出試験 (25、40、60℃で 10 日間) を行った。FA は、25℃の溶出試験ではいずれも定量限界 (2 ng/mL) 未満であったが、40℃では 4 試料から 2.2~2.7 ng/mL、60℃では 3 試料から 6.4~8.6 ng/mL の溶出が認められた。AA も 25℃の溶出試験では全て定量下限 (2 ng/mL) 未満であったが、40℃では 1 試料から 4.7 ng/mL、60℃では 3 試料から 23.8~50.1 ng/mL の溶出が認められた。いずれも温度が高いほど溶出量が多くなり、ペットボトルからの AA 及び FA の溶出量は温度に依存することが示唆された。また、FA に比べ AA の溶出量が高い傾向が見られた。

表 4-2 短期間溶出試験におけるホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド溶出量

試料	ホルムアルデヒド			アセトアルデヒド		
	25℃10日	40℃10日	60℃10日	25℃10日	40℃10日	60℃10日
Blank	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	6.4 ± 0.5 (7.0)	ND	4.7 ± 1.7 (36.2)	35.1 ± 2.5 (7.2)
C	ND	ND	6.8 ± 0.3 (4.6)	ND	ND	23.8 ± 1.5 (6.3)
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G	ND	2.7 ± 0.1 (3.8)	-	ND	ND	-
H	ND	2.2 ± 0.0 (1.7)	8.6 ± 0.6 (7.3)	ND	ND	50.1 ± 6.5 (12.7)
L	ND	2.2 ± 0.3 (13.4)	-	ND	ND	-
N	ND	2.4 ± 0.0 (1.0)	-	ND	ND	-
P	ND	ND	-	ND	ND	-

Mean (ng/mL) ± SD (RSD%) (n=3)

ND: Not determined (< 2 ng/mL)

③ 未使用のペットボトルを用いた長期間溶出試験 (10 日~12 ヶ月間、25℃)

②と同様の未使用のペットボトル 8 試料に食品擬似溶媒として水を充填し、25℃で 10 日、3、6、9、12 ヶ月間保存し、AA 及び FA を測定した。その結果を図 4-1 に示した。

FAは3もしくは6ヶ月目からわずかに溶出し始めた。その後徐々に増加し、12ヶ月後では全ての試料から溶出が認められ、12ヶ月後の溶出量は5.2~36.1 ng/mLとなった。一方AAは、8試料中5試料から溶出が認められた。試料によりその溶出挙動は大きく異なっており、FAと同様に徐々に溶出するものもあったが、溶出量が増減をするもの、9ヶ月目だけ溶

出するものなどがあつた。その原因として、ペットボトル材質中のAA含有量がばらついて
いる可能性が考えられた。なお、AAの最大溶出量は約100 ng/mLであつた。FA及びAAのい
ずれにおいても、ボトルEでは12ヶ月経過後に急激に溶出量が増加した。

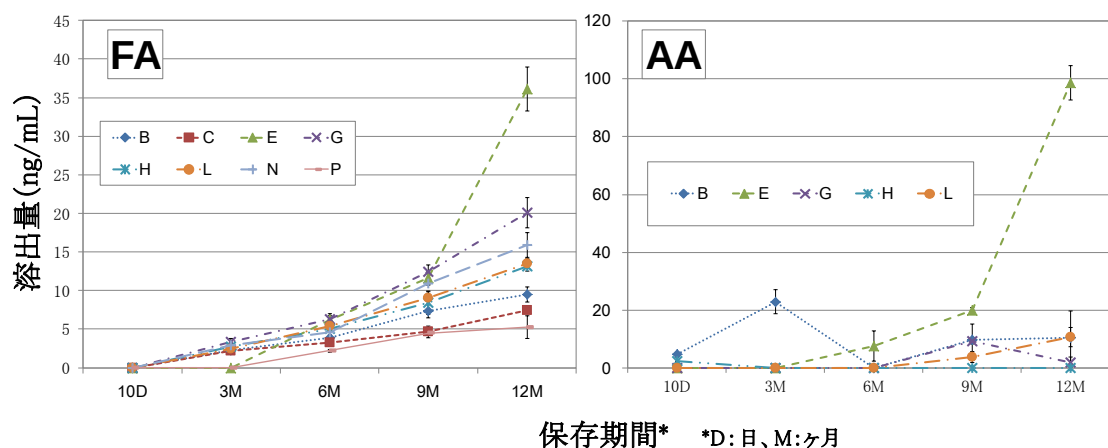


図 4-1 長期間溶出試験におけるホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド溶出量

④ 未使用のペットボトルの FA 及び AA 含有量の検証

③の未使用ペットボトルを用いた長期溶出試験の結果、FA 及び AA とともに保存時間が長いほど溶出量が多くなる傾向がみられた。また、溶出量は FA に比べ AA の方が多かったことから、試料中のそれぞれの含有量が異なっていた可能性があつた。また、AA は同一試料でも測定値のばらつきが大きい傾向があり、同一試料における AA 含有量にばらつきがある可能性が考えられた。

そこで、用いたペットボトル試料中の FA 及び AA 含有量を測定し、比較した (表 4-3)。FA の含有量は 0.54~0.73 $\mu\text{g/g}$ 、AA の含有量は 6.2~10.6 $\mu\text{g/g}$ であり、AA の方が約 10 倍高い値であつた。したがって、AA の溶出量が多いのは試料中の含有量が多いためであると考えられた。

一方、ばらつきを示す相対標準偏差 (RSD) は、FA は 3.6-11.9%、AA は 3.9-16.1%とほぼ同程度であり、いずれも特に大きい値ではなかつた。したがって、AA における溶出量のばらつきは試料中の含有量のばらつきによるものではないと考えられた。また、試料 B と L のように、AA の含有量が 7.4 $\mu\text{g/g}$ 、溶出量が約 10.5 ng/mL とほぼ同じ結果が得られる試料もあつたが、試料 E 及び P の様に、含有量が約 10.5 $\mu\text{g/g}$ と同等でも溶出量がそれぞれ 98.7 ng/mL 及び ND (< 2 ng/mL) と大きく異なる試料もあり、含有量と溶出量との間には相関関係はなかつた。本研究において溶出量がばらついた原因を特定することはできなかつたが、AA の沸点は 20.2℃と溶出試験温度 (25℃) と近い温度であつたことから、溶出した AA が気化したものや一部気化したものなどがあつたため、溶出量にばらつきが生じた可能性が考えられた。

表 4-3 ペットボトル中の FA 及び AA 含有量

試料	ホルムアルデヒド		アセトアルデヒド	
	含有量	溶出量	含有量	溶出量
B	ND	9.5 ± 1.0 (10.5)	7.4 ± 0.5 (6.9)	10.4 ± 9.3 (89.2)
C	ND	7.4 ± 0.3 (4.5)	6.2 ± 1.0 (16.1)	ND
E	0.69 ± 0.02 (3.6)	36.1 ± 2.9 (7.9)	10.6 ± 0.9 (8.9)	98.7 ± 5.9 (6.0)
G	0.63 ± 0.08 (11.9)	20.1 ± 1.9 (9.6)	7.2 ± 1.0 (13.2)	ND
H	0.64 ± 0.05 (7.5)	13.1 ± 0.6 (4.8)	7.5 ± 0.5 (6.8)	ND
L	0.54 ± 0.05 (8.4)	13.5 ± 0.6 (4.4)	7.4 ± 0.4 (4.8)	10.7 ± 3.4 (31.6)
N	0.73 ± 0.07 (9.0)	15.9 ± 1.6 (10.1)	8.0 ± 0.7 (8.5)	ND
P	ND	5.2 ± 1.5 (27.8)	10.5 ± 0.4 (3.9)	ND

残存量: Mean (µg/g) ± SD (RSD%) (n=3), ND < 0.5 µg/g

溶出量: 図4-1の12ヶ月後の溶出量

ただし n=3 のうち 2 以上が ND の場合は ND とした

⑤ 実態調査

東京都、大阪府内のスーパー、コンビニエンスストアやインターネットで購入した市販ミネラルウォーター合計 105 試料について FA 及び AA 量を測定した。その結果をペットボトルの容量や製造国等別に表 4-4 及び図 4-2 に示した。

全 105 試料中 FA は 64 試料 (61%) から 2.6~31.4 ng/mL 検出され、平均値は 11.0 ng/mL であった。一方、AA は 71 試料 (68%) から 5.3~142.0 ng/mL 検出され、平均値は 44.8 ng/mL であった。

続いて内容量、製造国等別に比較した。検出率は、ペットボトル容量が 237~600 mL の国産ミネラルウォーターでは、FA 及び AA ともにおよそ 90%と高い検出率であった。一方、海外産ミネラルウォーターでは炭酸入り製品の AA を除き、FA 及び AA の検出率は 20~30%程度と国産に比べ大幅に低い値であった。六鹿らは、海外産のミネラルウォーター中には FA 及び AA を分解する細菌が存在していることを報告している。したがって本研究において海外産のミネラルウォーターにおける FA 及び AA の検出率が低かったのも、ミネラルウォーター中の細菌によって分解されたことが主な原因であると考えられた。

また、ペットボトル容量が 1,020~2,000 mL のものは国産/無炭酸のもので 60~70%程度と内容量が小さいものの約 2/3 であった。

FA 及び AA 量については、試料数及び検出数が十分であった 237~600 mL の国産/無炭酸、国産/炭酸入り、海外産/無炭酸及び 1,020~2,000 mL の国産/無炭酸のものについて比較した。FA 及び AA ともに国産と海外産、炭酸の有無の違いによる顕著な差は見られず、これらの差はボトルの種類の差によるものと推測された。一方、内容量が大きいものの FA 及び AA 量は、ともに内容量が小さいものの約半分であった。

以上の様に検出率並びに FA 及び AA 量ともに、内容量が大きいものほど低いもしくは小さい傾向が認められた。これはミネラルウォーターとペットボトルとの接触面が、内容量が大きいものほど小さいためと考えられた。

過去に報告されたペットボトル入りミネラルウォーター中の FA 及び AA 量に関する研究結果を表 4-5 にまとめ、本研究結果と比較した。本研究及び過去の研究における FA 量は、それぞれ 2.6~31.4 及び 1.3~64.6 ng/mL であり、最大値は過去の方が大きかった

が、ほぼ同程度であると考えられた。同様に AA 量も、5.3～142.0 及び 0.7～317.8 ng/mL であり、同程度であるといえた。また、本研究において AA の最大値は FA の最大値の 4～5 倍程度であったが、過去の研究においてもほぼ同程度の割合であることが明らかとなった。続いて、日本で実施された研究結果と比較した。約 15 年前に比べると FA 及び AA の最大値はいずれも約半分程度まで減少していたが、約 10 年前からはほとんど変わっていないかった。また、海外製品からは検出しないという傾向も変わっていないかった。したがって、ペットボトル入りミネラルウォーター中の FA 及び AA の特徴は約 10 年前と大きく変わっていないことが明らかとなった。

表4-4 市販製品中のFA及びAA量

種類	検体数	検出数(検出率%)		溶出量 (ng/mL)					
		FA	AA	FA			AA		
				最小値	最大値	平均値	最小値	最大値	平均値
全体	105	64 (61)	71 (68)	2.6	31.4	11.0	5.3	142.0	44.8
内容量 237～600 mL	国産/無炭酸	32	29 (91)	2.7	21.4	11.1	14.0	142.0	54.8
	国産/炭酸入り	9	8 (89)	9.5	27.3	17.9	31.5	115.5	68.3
	海外産/無炭酸	28	9 (32)	2.9	31.4	18.0	22.6	100.6	48.3
	海外産/炭酸入り	5	1 (20)	5.7	—	5.7	5.3	50.6	25.7
内容量 1,020～2,000 mL	国産/無炭酸	26	16 (62)	2.6	13.1	5.4	7.6	70.9	25.2
	国産/炭酸入り	0	—	—	—	—	—	—	—
	海外産/無炭酸	4	0 (0)	—	—	—	—	—	—
	海外産/炭酸入り	1	1 (100)	7.2	—	—	52.1	—	—

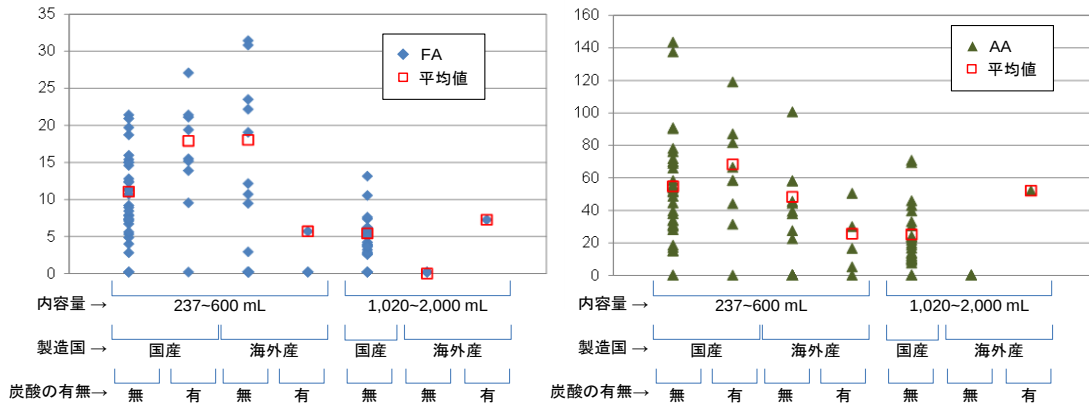


図 4-2 市販製品中の FA 及び AA 量

表4-5 過去の研究報告との比較

発表年	発表者	製品の製造国	総検体数	ホルムアルデヒド (ng/mL)	アセトアルデヒド (ng/mL)	参考情報
本研究	六鹿、阿部ら	日本、アメリカ、フランス、フィジー、スコットランド、イタリア、ドイツ、韓国など	105	2.6 - 31.4	5.3 - 142.0	
2015	Baumjohann et al.	ドイツ	305	測定していない	2.1 - 91.7	試験前に40℃10日間暗所に保管
2006	Mutsuga et al.	日本、フランス、イタリア、UK、カナダ、アメリカ	19	7.9 - 27.9	37.2 - 107.8	海外製品からはほとんど検出なかった
2002	Nawrocki et al.	ポーランド	不明	2.2 - 64.6	4.7 - 317.8	
2001	Sugaya et al.	日本、フランス、イタリア、アメリカ、UKなど	33	1.3 - 59	0.7 - 260	フランス、イタリア、UK 製品では全て定量下限 (0.5 ng/mL) 未満
1994	平山ら	日本	3	5.9 - 14.8	測定していない	

⑥ 市販製品の長期保存による影響 (0～12 ヶ月、25℃)

③の未使用のペットボトルを用いた長期溶出試験において、経時変化とともにFA 溶出量が増加することを確認した。また、AA 溶出量についてもばらつきはあるものの増加傾向を示すものが認められた。そこで、市販のミネラルウォーターについても保存期間が長くなるにつれ、FA 及び AA 量が増加するか検証を行った。市販のミネラルウォーター14 種類を 25℃で 0、10 日、1、2、3、6、9 及び 12 ヶ月保存しそれぞれの FA 及び AA 量を測定し、経過時間に伴う変化を確認した。その結果を表 4-6 に示す。FA は 6 ヶ月で 1.3～3.0 倍増加し、12 ヶ月では 1.9～4.3 倍まで増加した。12 ヶ月後の最大量は 51.6 ng/mL であり、ミネラルウォーター中の FA の規格値である 80 ng/mL よりも低い値であった。AA は 6 ヶ月で 1.1～2.0 倍増加し、12 ヶ月では 1.4～2.2 倍まで増加した。増加率は FA に比べると小さい値であり、12 ヶ月後の最大量は約 300 ng/mL であった。以上の様に保存に伴い FA 及び AA 量は増加していくと推測された。また、FA 及び AA の増加率はミネラルウォーターの pH や硬度とは無関係であったことからペットボトルの種類によって異なると推測された。

表 4-6 市販ミネラルウォーターにおける長期保存時の FA 及び AA 量の変化

試料	ホルムアルデヒド							
	0日後	10日後	1ヶ月後	2ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	9ヶ月後	12ヶ月後
国産1	8.2 ± 0.3 (3.1)	9.6 ± 0.2 (2.1)	10.3 ± 0.8 (7.8)	10.9 ± 0.2 (1.9)	10.3 ± 0.2 (1.5)	16.4 ± 0.6 (3.3)	17.4 ± 1.0 (6.0)	22.1 ± 0.2 (1.1)
国産2	8.5 ± 0.1 (1.4)	9.3 ± 0.7 (7.4)	9.2 ± 0.2 (2.2)	9.1 ± 0.6 (7.0)	7.9 ± 0.1 (1.5)	12.1 ± 0.8 (6.3)	14.0 ± 0.7 (5.0)	16.3 ± 1.6 (9.7)
国産3	11.3 ± 1.7 (15.0)	11.2 ± 0.2 (1.5)	12.7 ± 0.7 (5.5)	13.4 ± 1.3 (10.0)	13.4 ± 0.3 (2.4)	18.5 ± 1.7 (9.1)	18.5 ± 0.2 (103)	24.7 ± 0.8 (3.4)
国産4	5.0 ± 0.4 (8.0)	5.3 ± 0.4 (6.8)	6.4 ± 0.2 (2.7)	6.4 ± 0.2 (3.6)	7.8 ± 0.1 (0.7)	9.7 ± 0.2 (1.6)	9.6 ± 0.3 (3.3)	12.8 ± 0.9 (6.8)
国産5	< 2	< 2	2.1 ± 0.2 (9.5)	3.0 ± 0.4 (14.5)	4.5 ± 0.4 (7.7)	6.2 ± 0.2 (3.4)	6.2 ± 0.3 (4.5)	9.1 ± 0.4 (4.8)
海外産1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
海外産2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
国産炭酸入1	27.1 ± 0.3 (1.1)	27.7 ± 0.9 (3.4)	29.3 ± 1.5 (5.3)	27.4 ± 1.4 (5.1)	28.1 ± 1.3 (4.4)	35.4 ± 4.1 (11.5)	39.1 ± 1.1 (2.8)	51.6 ± 3.6 (7.0)
国産炭酸入2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
国産6	9.0 ± 0.4 (4.6)	-	-	-	-	16.0 ± 0.2 (1.1)	-	20.1 ± 0.4 (1.8)
国産7	15.3 ± 0.1 (0.8)	-	-	-	-	29.7 ± 2.0 (6.6)	-	46.7 ± 0.6 (1.3)
国産8	< 2	-	-	-	-	< 2	-	< 2
国産9	2.5 ± 0.1 (4.0)	-	-	-	-	4.7 ± 0.3 (6.8)	-	7.0 ± 0.7 (10.2)
国産炭酸入3	9.8 ± 0.2 (1.8)	-	-	-	-	18.7 ± 0.8 (4.5)	-	23.2 ± 1.1 (4.9)
試料	アセトアルデヒド							
	0日後	10日後	1ヶ月後	2ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	9ヶ月後	12ヶ月後
国産1	65.1 ± 7.4 (11.4)	68.1 ± 11.0 (16.1)	62.9 ± 0.8 (1.2)	70.0 ± 11.3 (16.1)	70.4 ± 8.6 (12.2)	92.1 ± 4.5 (4.9)	98.5 ± 7.6 (7.7)	111.6 ± 3.1 (2.8)
国産2	202.9 ± 7.5 (3.7)	202.8 ± 11.0 (5.4)	211.8 ± 3.4 (1.6)	207.8 ± 6.4 (3.1)	211.4 ± 10.6 (5.0)	243.3 ± 13.7 (5.6)	271.4 ± 10.0 (3.7)	293.7 ± 6.4 (2.2)
国産3	40.4 ± 3.1 (7.8)	32.9 ± 6.6 (20.0)	36.7 ± 3.9 (10.6)	40.5 ± 10.3 (25.5)	37.7 ± 7.3 (19.4)	66.6 ± 1.8 (2.7)	69.8 ± 10.6 (15.2)	77.7 ± 10.2 (13.1)
国産4	28.5 ± 2.0 (7.0)	31.3 ± 1.0 (3.2)	35.5 ± 5.5 (15.4)	40.1 ± 1.7 (4.3)	42.1 ± 0.8 (1.8)	44.7 ± 1.5 (3.4)	44.9 ± 1.8 (4.0)	50.2 ± 3.6 (7.2)
国産5	93.1 ± 3.0 (3.2)	94.2 ± 6.4 (6.8)	98.3 ± 9.8 (9.9)	115.8 ± 7.3 (6.3)	119.6 ± 3.8 (3.1)	147.3 ± 4.4 (3.0)	164.8 ± 5.6 (3.4)	209.4 ± 9.9 (4.7)
海外産1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
海外産2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
国産炭酸入1	123.1 ± 6.2 (5.1)	131.3 ± 8.8 (6.7)	127.5 ± 6.0 (4.7)	129.1 ± 3.7 (2.8)	136.5 ± 5.0 (3.7)	144.3 ± 24.4 (16.9)	167.9 ± 8.0 (4.8)	202.4 ± 7.2 (3.6)
国産炭酸入2	16.9 ± 1.6 (9.2)	16.1 ± 0.6 (3.4)	15.0 ± 0.6 (3.7)	17.9 ± 0.5 (3.0)	19.7 ± 2.9 (14.7)	18.2 ± 0.9 (4.9)	22.7 ± 2.6 (11.4)	24.5 ± 1.4 (5.6)
国産6	53.0 ± 3.4 (6.5)	-	-	-	-	94.4 ± 3.6 (3.8)	-	108.5 ± 13.7 (12.7)
国産7	43.5 ± 5.5 (12.7)	-	-	-	-	85.3 ± 8.1 (9.4)	-	94.5 ± 6.9 (7.3)
国産8	< 2	-	-	-	-	< 2	-	< 2
国産9	52.6 ± 2.6 (4.9)	-	-	-	-	85.5 ± 15.0 (17.5)	-	91.6 ± 8.6 (9.3)
国産炭酸入3	78.2 ± 2.9 (3.8)	-	-	-	-	149.8 ± 10.6 (7.1)	-	159.9 ± 17.3 (10.8)

ng/mL, 平均値 ± SD (RSD%) (n=3)

⑦ まとめ及び考察

水道水中のホルムアルデヒド (FA) 及びアセトアルデヒド (AA) 分析法を参考に、LC-MS/MS を用いた改良法の検討を行った。改良法は従来の HPLC もしくは GC-MS を用いた方法と比較して、使用する試料、試薬、ガラス器具類などの他、試験時間を大幅に削減することに成功した。また性能評価を実施し、様々な pH や硬度のミネラルウォーター中の FA 及び AA 量を正確に定量できることを確認した。

未使用のペットボトルを使用した溶出試験を行い、本法を用いて溶出量を測定した。その結果、FA の溶出量は試料ごとに異なっていたが、保存時間が長いほど、保存温度が高いほど溶出量が多くなった。AA も多少ばらつきはあったが、FA と同様の傾向を示した。また、長期保存したミネラルウォーター中の FA 及び AA 量はミネラルウォーターの pH や硬度の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。したがって、ペットボトルから溶出する FA 及び AA 量の違いはボトルの種類によることが大きいことが示唆された。

また、市販のペットボトル入りミネラルウォーター中の FA 及び AA 量を測定した。その結果、FA は全 105 試料中 64 試料 (61%) から検出し、その量は 2.6~31.4 ng/mL であった。一方 AA は 71 試料 (68%) から検出し、5.3~142.0 ng/mL であった。我が国で実施された過去の報告と比較して、10 年前の調査と大きな違いは見られなかった。

このように本研究では、より簡便な分析法を開発するとともに、国内流通試料を対象とした 12 ヶ月という非常に長期の溶出試験を実施した初めての研究報告である。さらに、100 試料を超える非常に多くの試料を対象とした実態調査も行い、得られた知見は非常に価値のあるものであると考えられる。

研究全体の成果、考察及び結論

① ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量の推定

本研究では、国内で使用されているペットボトルを対象として、溶出する可能性のある化学物質を探索、同定し、ICP-MS、ICP-OES、PT-GC-MS、LC-MS 等の質量分析計を装備した高感度・高精度な機器を用いて25物質の溶出量を測定した。いずれの化学物質も保存温度が高くなるほど、保存期間が長くなるほど溶出量は増加した。

これらの化学物質について、推定ばく露量の算出を試みた。米国では合成樹脂中の化学物質のばく露量推定法として、規定条件下での溶出試験により得られた溶出量をもとに、合成樹脂ごとに定められた消費係数と食品分配係数を用い、1日の食事量を3 kgとして、推定摂取量（推定ばく露量）を算出している。なお、消費係数とはそれぞれの樹脂が市場の合成樹脂製容器包装に占める割合であり、PET 樹脂は0.16である。食品分配係数とは当該樹脂製容器包装が使用される食品の食品群ごとの割合であり、PET 樹脂は中性食品 0.01、酸性食品 0.97、アルコール食品 0.01、脂肪性食品 0.01である。また、広瀬らは、平成17～19年度の食品健康影響評価技術研究「器具・容器包装に用いられる合成樹脂のリスク評価法に関する研究」において、食品安全委員会における器具・容器包装に用いられる合成樹脂の健康影響評価のためのリスク評価のためのガイドライン案を作成している。その中でばく露量推定法については、上記の米国方式をもとに、我が国の器具・容器包装の使用実態や食品摂取量に対応した算出方法を提案している。本研究では、米国や広瀬らの算出方法を参考にして、食品用ペットボトルから溶出する化学物質のばく露量推定を行う予定であった。しかしながら、PET 樹脂はペットボトルだけでなく、トレイやコップ等の様々な製品に用いられており、上記の方法に倣って算出した場合、PET 樹脂全体からの推定ばく露量となってしまう。今回の研究で用いた清涼飲料水用のペットボトルから溶出する化学物質のばく露量をより正確に推定するために、食品分配係数及び消費係数を用いずに、各化学物質の溶出量に一日あたりの清涼飲料の摂取量を乗じて推定ばく露量を求めた。

各化学物質の溶出量は未使用のペットボトル8試料（B, C, E, G, H, L, N, P）を用いた25℃12ヶ月と40℃10日の溶出試験結果を用いた。ペットボトル飲料の賞味期限は、果汁飲料、炭酸飲料や乳成分を含んだ紅茶やコーヒーは約6ヶ月、お茶は約1年、ミネラルウォーターは約2年である。本研究では最長で25℃12ヶ月の溶出試験を実施したことから、25℃12ヶ月での溶出量を用いて推定ばく露量の算出を行った。また、室温（25℃）で長期間保存されるものについては米国では40℃10日、EUでは40～60℃（30日以下：40℃、半年以下：50℃、半年を超える：60℃）で10日の溶出試験が規定されている。これらの条件はいわゆる加速試験条件であり、半年や1年など長期にわたる溶出試験を実施するのが困難であることから、ほぼ同等の溶出量となる条件として設定されている。そこで、本研究では40℃10日の溶出試験結果を用いたばく露量推定も行い、25℃12ヶ月の結果と比較した。それぞれの条件における溶出試験結果は最大値を用いた。なお、試験したペットボトル8試料全てにおいて定量下限値未満（ND）だった場合は、定量下限値を最大値として用いた。

一日あたりの清涼飲料の摂取量は、一般社団法人全国清涼飲料工業会による「清涼飲料水関係統計資料（2016年）」をもとに以下のように見積もった。2015年の1人あたりの清涼飲料の消費量は161,013 mL、すなわち1日あたり約440 mLであった。清涼飲料の容器

として、ペットボトル、缶、びん、紙等が用いられているが、このうちペットボトルの占める割合は同統計資料により 70.9%であることから、1 日あたりのペットボトル入り清涼飲料の摂取量は、312 mL と見積もられた。さらに、清涼飲料をミネラルウォーター、お茶等の中性飲料と炭酸飲料や果汁飲料等の概ね pH5 以下の酸性飲料に分類すると、中性飲料と酸性飲料の割合は約 60%及び 40%であり、1 日あたりの中性飲料及び酸性飲料の摂取量はそれぞれ 187 mL 及び 125 mL であった。

以上より、リアリスティックケースにおける推定ばく露量は以下の式により算出した。

リアリスティックケースにおける推定ばく露量 (ng/日)

$$= (\text{水への溶出量 (ng/mL)} \times 187 \text{ mL} + 4\% \text{酢酸への溶出量 (ng/mL)} \times 125 \text{ mL})$$

ただし、揮発性物質やアセトアルデヒド、ホルムアルデヒド等の 4%酢酸では溶出試験が実施できない物質については、水への溶出量の結果を用いて推定ばく露量を算出した。

リアリスティックケースにおける推定ばく露量 (ng/日) = (水への溶出量 (ng/mL) × 312 mL)

さらに、今回実施した溶出試験において、50%エタノールへの溶出量は全ての化学物質において水や 4%酢酸に比べて高かった。これは、50%エタノールが水等よりも PET 樹脂に浸透しやすいためである。50%エタノールは EU ではアルコール性食品及び乳製品の食品擬似溶媒として用いられており、今回用いたペットボトルはこれらの食品には使用されない。そのため、過剰な見積もりとなるが、50%エタノールにのみ溶出する化学物質のばく露量を概算するために、参考として 50%エタノールへの溶出量を用いた推定ばく露量を算出した。なお、算出した推定ばく露量は実際の摂取量よりも過大な見積もりであり、ワーストケースにおけるばく露量となる。

ワーストケースにおける推定ばく露量 (ng/日)

$$= (50\% \text{エタノールへの溶出量 (ng/mL)} \times 312 \text{ mL})$$

水及び 4%酢酸への溶出量を用いて算出した推定ばく露量を表 I に示した。測定した 25 物質のうち、実測値が得られたのは 6 物質であり、推定ばく露量は 25°C12 ヶ月で 0.28 (アンチモン) ~30.8 (アセトアルデヒド) $\mu\text{g/日}$ 、40°C10 日で 0.17 (HECB acid) ~1.5 μg (アセトアルデヒド) /日であった。

表 I 水及び4%酢酸への溶出量を用いた推定ばく露量（リアリストイックケース）

			25℃12ヶ月		40℃10日	
	化学物質	食品擬似溶媒	最大 溶出量 (ng/mL)	推定 ばく露量 (μ g/日)	最大 溶出量 (ng/mL)	推定 ばく露量 (μ g/日)
金属類	アンチモン	水	0.7	0.28	0.62	0.22
		4%酢酸	1.1		0.83	
	ゲルマニウム	水	6.7	2.2	2.5	0.94
		4%酢酸	7.5		3.8	
	チタン*	水、4%酢酸	<2	<0.62	<2	<0.62
	コバルト*	水、4%酢酸	<0.1	<0.031	<0.1	<0.031
揮発性物質	リン*	水、4%酢酸	<20	<6.2	<20	<6.2
	2-メチル-1,3-ジオキソラン	水	1.9	0.59	0.78	0.24
	シクロペンタノン*	水	<0.1	<0.031	<0.1	<0.031
	ベンズアルデヒド*	水	<0.5	<0.16	<0.5	<0.16
	デカナール*	水	<0.5	<0.16	<0.5	<0.16
	ノナナール*	水	<0.5	<0.16	<0.5	<0.16
モノマー類	ジエチレングリコール*	水、4%酢酸	<50	<16	<50	<16
	ブタンジオール*	水、4%酢酸	<20	<6.2	<20	<6.2
	ジメチルテレフタル酸*	水、4%酢酸	<20	<6.2	<20	<6.2
	ビスヒドロキシエチルテレフタル酸*	水、4%酢酸	<0.5	<0.16	<0.5	<0.16
オリゴマー類	HECB acid	水	4.2		0.57	
		4%酢酸	3.1	1.2	0.48	0.17
	HECBOECB acid*	水	<0.02	<0.17	<0.02	<0.014
		4%酢酸	1.3		0.08	
	HEECB acid*	水、4%酢酸	<0.05	<0.016	<0.05	<0.016
	HEECBOECB acid*	水、4%酢酸	<0.02	<0.0062	<0.02	<0.0062
環状オリゴマー	環状2量体*	水、4%酢酸	<10	<3.1	<10	<3.1
	環状3量体*	水、4%酢酸	<10	<3.1	<10	<3.1
	環状4量体*	水、4%酢酸	<10	<3.1	<10	<3.1
	環状5量体*	水、4%酢酸	<10	<3.1	<10	<3.1
	環状6量体*	水、4%酢酸	<20	<6.2	<20	<6.2
アルデヒド	アセトアルデヒド	水	98.7	30.8	4.7	1.5
	ホルムアルデヒド	水	36.1	11.3	2.7	0.84

*定量下限値を最大溶出量とし、推定ばく露量を算出した

25℃12ヶ月及び40℃10日の溶出試験結果により得られた推定ばく露量はほぼ同等であったが、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、HECB acid及びHECBOECB acidは25℃12ヶ月により得られた値が40℃10日に比べて約10～20倍高い結果となった。これらはいずれもボトルE（25℃12ヶ月）の結果を最大値として採用していた。ボトルEは保存期間9ヶ月まではいずれの物質においても他のボトルに比べて溶出量が比較的低い傾向を示したが、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、HECB acid及びHECBOECB acidについては12ヶ月経過後に急激に溶出量が増加した。本ボトルは酸素や二酸化炭素などのガス透過性を改良するために内面処理が施されており、長期間保存することにより内面処理になんらかの変化があったと推測された。その他の物質は定量下限値未満であり、推定ばく露量は25℃12ヶ月及び40℃10日のいずれにおいても16 μ g/日未満と見積もられた。

50%エタノールへの溶出量を用いて算出したワーストケースの推定ばく露量を表 II に示した。測定した 23 物質のうち、実測値が得られたのは 7 物質であり、推定ばく露量は 25℃12 ヶ月で 0.30 (アンチモン) ～8.2 (環状 3 量体) $\mu\text{g}/\text{日}$ 、40℃10 日で 0.37 (HECBOECB acid) ～15.6 (環状 3 量体) $\mu\text{g}/\text{日}$ であった。25℃12 ヶ月及び 40℃10 日の溶出試験結果より得られた推定ばく露量はほぼ同等であった。その他の物質は定量下限値未満であり、推定ばく露量は 25℃12 ヶ月及び 40℃10 日のいずれにおいても 16 $\mu\text{g}/\text{日}$ 未満と見積もられた。

表 II 50%エタノール溶出量を用いた推定ばく露量 (ワーストケース)

化学物質		25℃12ヶ月		40℃10日	
		最大 溶出量 (ng/mL)	推定 ばく露量 ($\mu\text{g}/\text{日}$)	最大 溶出量 (ng/mL)	推定 ばく露量 ($\mu\text{g}/\text{日}$)
金属類	アンチモン	0.98	0.30	1.8	0.56
	ゲルマニウム	14	4.3	7.2	2.2
	チタン*	<2	<0.62	<2	<0.62
	コバルト*	<0.1	<0.031	<0.1	<0.031
	リン*	<20	<6.2	<20	<6.2
揮発性物質	2-メチル-1,3-ジオキソラン	12	3.8	5.1	1.6
	シクロペンタン*	<10	<3.1	<10	<3.1
	ベンズアルデヒド*	<50	<16	<50	<16
	デカナール*	<50	<16	<50	<16
	ノナナール*	<50	<16	<50	<16
モノマー類	ジエチレングリコール*	<50	<16	<50	<16
	ブタンジオール*	<20	<6.2	<20	<6.2
	ジメチルテレフタル酸*	<20	<6.2	<20	<6.2
	ビスヒドロキシエチルテレフタル酸	1.7	0.53	1.6	0.50
オリゴマー類	HECB acid	2.0	0.62	1.8	0.56
	HECBOECB acid	1.6	0.50	1.2	0.37
	HEECB acid	<0.05	<0.016	<0.05	<0.016
	HEECBOECB acid	<0.02	<0.0062	<0.02	<0.0062
環状オリゴマー	環状2量体*	<5	<1.6	<5	<1.6
	環状3量体	26.3	8.2	50	15.6
	環状4量体*	<5	<1.6	<5	<1.6
	環状5量体*	<5	<1.6	<5	<1.6
	環状6量体*	<10	<3.1	<10	<3.1

*定量下限値を最大溶出量とし、推定ばく露量を算出した

② 推定ばく露量と TDI (ADI) との比較

耐容一日摂取量 (TDI) もしくは許容一日摂取量 (ADI) が設定されているアンチモンやホルムアルデヒド等について、①で算出した推定ばく露量 (リアリスティック及びワーストケース) と比較を行った。いずれも 25℃12 ヶ月の溶出試験結果を用いて算出した推定ばく露量を用いた。定量下限値未満 (ND) だった場合は、定量下限値を用いた。

その結果、TDI もしくは ADI に対する割合は 0.0001%未満～1.4%であり、十分に低い値であった (表 III)。

表 III 推定ばく露量と TDI 値 (ADI 値) との比較

化学物質	リアリスティックケース		ワーストケース		TDI (ADI ^{***})
	推定ばく露量* (μ g/日)	TDI(ADI) 比** (%)	推定ばく露量* (μ g/日)	TDI(ADI) 比** (%)	
金属類	アンチモン	0.28	0.08	0.30	0.1 6 μ g/体重kg/日 (WHO飲料水質ガイドライン)
揮発性物質	ベンズアルデヒド	<0.16	<0.0001	<16	<0.006 Group TDI=5mg/体重kg/日 (EU 食品科学委員会)
モノマー類	ジエチレングリコール	<6.2	<0.1	<6.2	<0.1 0.1mg/体重kg/日 ^{***} (FDA)
	ブタンジオール	<6.2	<0.1	<6.2	<0.1 0.125mg/体重kg/日 ^{***} (FDA)
	ジメチルテレフタル酸	<6.2	<0.01	<6.2	<0.01 1mg/体重kg/日 (EU 食品科学委員会)
アルデヒド	アセトアルデヒド	30.8	0.56	-	- Group TDI=0.1mg/体重kg/日 (EU 食品科学委員会)
	ホルムアルデヒド	11.3	1.4	-	- 15 μ g/体重kg/日 (厚労省 水質基準)

*25℃12ヶ月の溶出試験結果より算出

**TDI(ADI) 比: 体重を55.1 kg (国民平均体重) としたときのTDI(ADI) に対する推定ばく露量の割合 (%)

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

なし

2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 岸 映里¹、尾崎麻子¹、大嶋智子¹、阿部 裕²、六鹿元雄²、山野哲夫¹（¹大阪市立環境科学研究所、²国立医薬品食品衛生研究所）、Multielement analysis in polyethylene terephthalate (PET) bottles used for beverages in Japan、ILSI Europe's 6th International Symposium on Food Packaging、スペイン、バルセロナ（平成28年11月16～18日）
- 2) 阿部 裕¹、小林憲弘¹、六鹿元雄¹、岸 映里²、尾崎麻子²、佐藤恭子¹（¹国立医薬品食品衛生研究所、²大阪市立環境科学研究所）、Determination of formaldehyde and acetaldehyde levels in PET-bottled mineral water using a rapid and simple analytical method、ILSI Europe's 6th International Symposium on Food Packaging、スペイン、バルセロナ（平成28年11月16～18日）
- 3) 阿部 裕¹、小林憲弘¹、山口未来¹、六鹿元雄¹、岸 映里²、尾崎麻子²、佐藤恭子¹、（¹国立医薬品食品衛生研究所、²地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）PETボトル入りミネラルウォーター中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド分析法の簡易化および実態調査、日本食品化学学会第23回総会・学術大会、三重県志摩市（平成29年6月1～2日）
- 4) 山本敦史¹、村上太郎²、岸映里²、静間基博³、尾崎麻子²（¹公立鳥取環境大学、²大阪市立環境科学研究所、³地方独立行政法人大阪市立工業研究所）、High resolution mass spectrometry as a sophisticated technique for screening non-intentionally added substances (NIAS) eluted from polyethylene terephthalate bottle、アメリカ化学会年会、アメリカ合衆国、ワシントン（平成29年8月20～24日）
- 5) 山本敦史¹、村上太郎²、岸 映里²、静間基博³、尾崎麻子²（¹公立鳥取環境大学、²地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所、³地方独立行政法人大阪産業技術研究所）、ペットボトルから溶出する化学物質に関する検討（0）高分解能質量分析計を用いるノンターゲット分析による物質同定、第113回日本食品衛生学会学術講演会、東京（平成29年11月9～10日）
- 6) 尾崎麻子¹、岸 映里¹、大嶋智子¹、角谷直哉¹、阿部 裕²、六鹿元雄²、山口之彦¹、山野哲夫¹（¹地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所、²国立医薬品食品衛生研究所）ペットボトルから溶出する化学物質に関する検討（1）揮発性物質の探索および PT-GC-MS 法による微量分析、第113回日本食品衛生学会学術講演会、東京（平成29年11月9～10日）
- 7) 岸 映里¹、尾崎麻子¹、大嶋智子¹、阿部 裕²、六鹿元雄²、山口之彦¹、山野哲夫¹（¹地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所、²国立医薬品食品衛生研究所）、ペ

ットボトルから溶出する化学物質に関する検討 (2) 金属類の溶出について、第113回日本食品衛生学会学術講演会、東京（平成29年11月9～10日）

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) ペットボトルから溶出する金属類及び揮発性物質の定性・定量ならびに推定摂取量の算出 ・ペットボトル溶出液の金属類 20 元素以上の一斉分析法を確立し溶出量の定量を行う。 ・ペットボトル溶出液の揮発性物質の探索を行い溶出量の定量を行う。 ・(2) ～ (4) の結果もあわせ化学物質の推定摂取量を算出する。	5	ペットボトルから溶出する金属類 34 元素及び揮発性物質 5 物質について、迅速、簡易、高感度かつ高精度な一斉分析法を確立し、本法を用いて未使用ペットボトルの短期間・長期間溶出試験を行い、溶出傾向を明らかとすることに成功した。さらに、当初計画にはなかった国内及び海外製の市販品ミネラルウォーターの実態調査を行い、保存期間の影響についても明らかにすることができた。研究内容については ILSI 6th International Symposium on Food Packaging (食品用器具・容器包装に関する国際学会)、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会にて成果を発表した。 さらに、(1) ～ (4) により溶出量を明らかにした 25 物質について、推定摂取量を算出し、TDI (ADI) との比較を行った。
(2) 高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析 ・実際の溶出液を用い、最も効率良くデータが取得できるイオン化パラメーター等、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) 測定条件を選択する。 ・得られる精密質量データ、出発物質、合成方法等の情	5	ペットボトルから溶出する可能性が高い極性化合物の構造決定を行い、これまでに報告のない新たな物質の同定に成功した。当初計画にはなかった DART-MS による同定もあわせて実施した。さらに、個別課題 (3) で実施する定量分析をより精度の高いものにするために、同位体標識した標準物質を合成した。研究内容については、第 254 回アメリカ化学会、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会にて成果を発表した。

報から生成物の構造解析を行う。		
(3) ペットボトル溶出成分の LC-MS を用いた定量 ・既知のモノマーや添加剤について溶出液からの定量法を確立する。 ・既知物質の定量結果から測定条件の適切化・最適化を行う。 ・(2) で同定した化学物質について分析法を確立し、溶出量の定量を行う。	5	既知のモノマー及び環状オリゴマー、また個別課題 (2) で同定した極性の高いオリゴマーといった幅広い物性を有する PET 溶出成分の分析法を確立に成功した。本法を用いて未使用ペットボトルの短期間・長期間溶出試験を行い、(2) で同定した新規物質が溶出することを見い出し、溶出傾向を明らかにした。研究内容については、第 254 回アメリカ化学会、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会にて成果を発表した。
(4) ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量 ・ペットボトル溶出液のアセトアルデヒド (AA) 及びホルムアルデヒド (FA) の分析法を確認し、溶出量の定量を行う。 ・国内外で製造された市販ペットボトル入り清涼飲料水約 100 試料中の AA 及び FA 量の実態調査を行う。	5	AA 及び FA の迅速、簡易、高感度かつ高精度な分析法を早期に確立し、本法を用いて未使用ペットボトルの短期間・長期間溶出試験を行い、溶出傾向を明らかとすることに成功した。さらに、市販品 105 試料を対象とした実態調査を行い、市販品についても当初予定していなかった保存期間の影響について明らかにすることができた。研究内容については ILSI 6th International Symposium on Food Packaging (食品用器具・容器包装に関する国際学会)、日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会にて成果を発表した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	全体的に達成目標を大きく上回る成果を得た。当初予定していなかった市販品の実態調査やそれらの保存期間による影響を明らかにすることができた。また、ペットボトルから溶出する可能性のある物質については DART-MS による同定も追加で行った。
(2) 研究成果の有用性	5	迅速・簡便で精度の高い揮発性物質、金属類、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド分析法を確立した。また、ペットボトルか

		ら溶出する可能性が高い極性化合物の構造決定を行い、これまでに報告のない新たな物質の同定に成功した。既知のモノマー及び環状オリゴマー、同定した極性の高いオリゴマーといった幅広い物性を有する PET 溶出成分の LC-MS を用いた分析法を確立した。これら 25 物質について、国内で使用されているペットボトルを用い、短期間及び長期間保存時の溶出量を定量し、推定ばく露量を算出した。国内流通試料を対象とした 1 年間にもおよぶ長期溶出試験を実施した初めての研究報告であり、得られた知見は価値の高いものである。また、これまでに報告のない結果が多く得られており、有用性は非常に高い。
総合コメント 当初の達成目標を大きく上回ることができ、食品安全委員会における今後のリスク評価に有用な成果を得た。また、研究内容については国内外の学会にて発表も行い、本研究の成果を世界的に広くアピールすることができた。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。