

＜その3＞総溶出物試験法の性能評価

研究分担者 藤原 恒司
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

A. 研究目的

現行の食品衛生法の器具および容器包装の規格基準の「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」では、個別規格が定められた合成樹脂製の器具又は容器包装、ゴム製の器具又は容器包装、食品に直接接触する部分が合成樹脂で塗装された金属缶（油脂および脂肪性食品を除いた乾燥食品を内容物とするものを除く）に対して蒸発残留物試験が設定されている。蒸発残留物試験は器具・容器包装から食品へ移行する不揮発性物質の総量を制限するための規格であり^{1,2)}、その試験溶液を調製する溶出操作では器具および容器包装の使用対象である食品の種類に応じて、ヘプタン、20%エタノール、水、4%酢酸が浸出用液として用いられる。

令和4年度に行った蒸発残留物試験および総不揮発性物質試験法の性能評価³⁾では欧州連合（EU）の Overall migration test を参考に総不揮発性物質試験を考案し、その性能評価を行った。その結果、溶出物が揮発しやすい物質である場合は、恒量になるまでに105°Cで2時間の乾燥操作を繰り返す必要があったことから試験に要する時間が長くなる傾向があった。さらに、乾燥操作を1回のみとする蒸発残留物試験よりも併行精度・室間再現精度が大きい結果となったことから、総不揮発性物質試験を規格試験法として導入することは困難であると結論付けられた。そこで本年度の研究では、以前行った蒸発残留物試験に関する検討⁴⁾の結果を参考として開発した「総溶出物試験」について、本試験法の性能を試験室間共

同試験により検証することとした。結果の解析にあたっては、令和4年度に行った蒸発残留物試験の結果を再解析し、総溶出物試験の結果と比較した。

B. 研究方法

1. 参加機関および試験所

試験室間共同試験には民間の登録検査機関、公的な衛生研究所など19機関が参加した。1機関は異なる2つの試験所で実施したため、本共同試験は合計で20試験所（試験所A～T）実施した。

2. 試験対象物質および試料原液

1) 試薬

テレフタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHTP) : ACROS ORGANICS 社製

1,2-シクロヘキサジカルボン酸ジイソノール (DINCH) : BASF 社製

リンゴ酸 : 富士フィルム和光純薬 (株) 製

マロン酸 : 関東化学 (株) 製

O-アセチルクエン酸トリエチル (ATEC) : 関東化学 (株) 製

トリエチレングリコール (TriEG) : 関東化学 (株) 製

テトラエチレングリコール (TetEG) : 関東化学 (株) 製

水 : オルガノ (株) 製超純水装置 PURELAB flex で精製した超純水

エタノール : 99.5%、残留農薬・PCB 試験用、富士フィルム和光純薬 (株) 製

ヘプタン：特級、富士フィルム和光純薬(株)製

2) 試料

表1に示したように、国立医薬品食品衛生研究所において6物質を溶質としてヘプタン又は20%エタノールで希釈し、6種類の試料を調製した。この試料6mLを褐色のガラス瓶に入れ、各試験所に溶質名および濃度非明示で10月2日に配布した。

3) 安定性の確認

試料の均質性については、一括調製した試料原液を小分けにして配布することによって担保した。配布した各試料の安定性については国立医薬品食品衛生研究所において試料中の濃度をGC-MS、LC-MS、又は定量NMR(qNMR)により定量することで確認した。

3. 試験

本年度の別課題により考案した総溶出物試験の手順、および「試験室間共同試験は共同実験プロトコル」(別添)に従って、試料1~6についてそれぞれ2併行の試験を試料入手後2ヶ月以内に行った。すなわち、TetEGを用いた予備試験により乾燥条件を設定した後、試料を20%エタノール又はヘプタンで100倍希釈した溶液を試験溶液として本試験を行った。また、各試験所において用いる秤量装置に関しては最小表示が0.1mg以下であるものを用いた。その他の試薬、器具等は、各試験所が通常の試験業務で使用しているものを用いた。

4. データの解析

各試験所から報告された残留物量(n=40)を用いて、併行精度(RSD_r)および室間再現

精度(RSD_R)を算出した。さらに、報告されたすべての結果から総合的に判断して「a 残留物量が明らかに多い結果」、「b 残留物量が明らかに少ない結果」および「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」に該当する結果を抽出した。これらa~cに該当した場合は、当該データを提出した試験所のデータを除いた際のRSD_rおよびRSD_Rについても算出した。具体的には、残留物量が試験溶液中に含まれる溶質量の120%を超えていたものを「a 残留物量が明らかに多い結果」、各試験所より報告された残留物量のヒストグラムを確認し、残留物量がデータ集団から乖離していたものを「b 残留物量が明らかに少ない結果」、各2試行のデータの差の平均値(Ave, mg)および標準偏差(SD, mg)を算出し、2試行のデータの差(D, mg)が式1を満たしたものを「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」と判断した。なお、昨年度の蒸発残留物試験の結果についても同様に判断して再解析し、残留物量の平均値、RSD_rおよびRSD_Rを算出した。

$$D > Ave + 2 \times SD \text{ (式1)}$$

C. 研究結果および考察

1. 試料の選定

試料は、令和4年度に行った蒸発残留物試験の結果と比較するため、4種は令和4年度と同じものとした。さらに、事前の簡易的な総溶出物試験において残留物の量が約50~70%であったTriEGおよびATECの2種の試料を加え、合計6試料とした。なお、追加したTriEGやATECの濃度については、予想される残留物量、蒸発残留物試験の規格値等を考慮して、TriEGは6000µg/mL、ATECは10000µg/mLとした。

表 1 本研究で使用した試料と調製濃度

試料	溶質	溶媒	試料原液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験溶液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	TriEG	20%エタノール	6000	60
2	リンゴ酸	20%エタノール	5000	50
3	マロン酸	20%エタノール	15000	150
4	DINCH	ヘプタン	10000	100
5	ATEC	ヘプタン	10000	100
6	DEHTP	ヘプタン	5000	50

2. 試験室間共同試験の結果

国立医薬品食品衛生研究所および各試験所（試験所 A～T）における蒸発乾固の条件、予備試験を経て設定した蒸発容器、乾燥器の設定温度等、並びに予備試験の結果を表 2、試料 1～6 の残留物量を表 3、これらの残留物量を基にした併行精度 (RSD_r) および室間再現精度 (RSD_R) を表 4 に示した。

1) 予備試験

公的な衛生研究所、民間の登録検査機関など 20 試験所において、指標物質による乾燥操作条件を検証した。TetEG を指標物質として 5 試行の平均残留物量と併行精度を算出した。それぞれの目標値として、平均残留物量は 7.0～9.0 mg、併行精度は 15%以下と設定し、この範囲内であることを確認した。いずれかの目標値を満たさないときは、使用する容器の形状、乾燥器の種類、乾燥温度等の乾燥操作条件を調節後、両目標値を満たすまで同様の操作を繰り返した。各試験所における最終的な乾燥操作条件とその際の平均残留物量および併行精度を表 2 に示した。

20 試験所のうち 17 試験所では、従来の乾燥操作条件で平均残留物量および併行精度の目標値を満たしたため、これらの試験所では乾燥条件を従来の条件から変更する必要はなかった。この結果は、各試験所における乾燥操作時の揮散の程度が、アルミニウム箔の蓋の使用により平準化されていることを示唆している。一方、試験所 E、G および M において

は、従来の乾燥操作条件では残留物量が目標値よりも低かったため、試験所 E および G では容器を蒸発皿から深さがあるビーカーへ、試験所 M では乾燥器の温度を 105°C から 80°C へ変更することで目標値を満たす乾燥操作条件を設定することができた。このように蒸発皿等の浅い容器を用いた試験所では、乾燥器の器内の実温度が設定温度よりも高い場合や送風量が多い乾燥器を用いた場合に、指標物質が揮散してしまい残留物量が低くなるため、容器の変更や乾燥温度の調節が必要であった。

2) 各試験所における試験条件

指標物質を用いた予備試験によって設定された乾燥条件は、試験所 M を除いた 19 試験所が蒸発残留物試験で規定されている乾燥条件と同様の条件 (105°C、2 時間) であり、試験所 M で設定された乾燥条件は 80°C、2 時間であった。また、乾燥器の送風方式に関しては、10 試験所 (試験所 A、F、G、H、I、J、L、Q、R、および T) が自然対流方式、残りの 10 試験所 (試験所 B、C、D、E、K、M、N、O、P、および S) が強制送風方式であった。また、使用する容器に関しては、12 試験所 (試験所 A、B、C、D、E、G、I、K、P、R、S、および T) がビーカー、6 試験所 (試験所 B、F、J、L、M、および Q) が蒸発皿、その他の 2 試験所では結晶皿 (試験所 H)、秤量びん (試験所 O) であった。

試験所 B は、試料 1～3 ではビーカー、試料

表2 各試験所における予備試験の条件と結果

試験所	蒸発容器	材質	直径 (cm)	高さ (cm)	容量 (mL)	蒸発乾固時の 加熱装置	乾燥器 (対流方式)	設定温度 (°C)	予備試験の結果	
									残留物量 ^{*3} (mg)	併行精度(%)
A	ビーカー	ガラス	5.5	6.5	100	ホットプレート	自然対流	105	9.0	5.9
B	ビーカー ^{*1}	ガラス	4.6	6.1	50	ホットプレート	強制送風	105	8.4	9.4
C	ビーカー	ガラス	6.5	8.8	200	ホットプレート	強制送風	105	7.9	7.3
D	ビーカー	ガラス	5.6	6.0	100	ホットプレート	強制送風	105	7.8	5.4
E	ビーカー	ガラス	7.0	9.0	260	ホットプレート	強制送風	105	8.2	6.0
F	蒸発皿	ガラス	9.6	5.0	200	水浴	自然対流	105	7.8	3.7
G	ビーカー	ガラス	5.5	7.0	100	ホットプレート	自然対流	105	8.6	7.0
H	結晶皿	ガラス	7.5	3.7	120	ホットプレート	自然対流	105	8.1	3.7
I	ビーカー	ガラス	6.0	11.5	200	ホットプレート	自然対流	105	8.3	7.3
J	蒸発皿	ガラス	6.0	3.0	30	水浴	自然対流	105	8.3	1.2
K	ビーカー	ガラス	6.0	7.0	100	ホットプレート	強制送風	105	9.0	3.5
L	蒸発皿	石英	6.5	3.5	50	ホットプレート	自然対流	105	7.3	3.6
M	蒸発皿	白金	7.7	3.5	140	定温送風乾燥機	強制送風	80	8.4	9.3
N	結晶皿	ガラス	7.5	10.4	300	ホットプレート	強制送風	105	7.7	2.2
O	秤量びん	アルミ	5.5 ^{*2}	2.5	50	ホットプレート	強制送風	105	8.1	8.6
P	ビーカー	ガラス	6.5	9.0	200	ホットプレート	強制送風	105	8.6	4.8
Q	蒸発皿	ガラス	7.0	4.0	80	ホットプレート	自然対流	105	8.9	3.6
R	ビーカー	ガラス	5.0	9.0	100	ホットプレート	自然対流	105	8.3	4.8
S	ビーカー	ガラス	4.6	6.0	50	ホットプレート	強制送風	105	7.4	11.2
T	ビーカー	ガラス	6.5	9.0	260	ホットプレート	自然対流	105	7.9	3.0

*1：試料 1-3 のみ、試料 4-6 は蒸発皿（直径：6.5 cm、高さ：3.6 cm、容量：200 mL）を使用

*2：開口部の直径

*3：5 試行の平均値

表 3 試験室間共同試験の本試験における試料 1~6 の残留物量

試験及び試験溶液	残留物量 (mg)																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
試験1	9.0	7.6	8.8	7.4	10.8	0.5 ^b	9.3	10.4	11.0	10.6	10.6	8.2	0.5 ^b	1.1 ^b	6.6	9.2	10.7	11.5	4.0 ^c	5.7
TriEG (12 mg/200 mL)	11.1	6.8	10.4	8.2	8.5	0.5 ^b	8.9	10.7	10.6	11.3	11.0	6.8	0.5 ^b	0.5 ^b	9.5	10.1	10.8	12.3	1.0 ^{b,c}	8.0
試験2	10.1	9.2	9.8	9.4	9.7	9.2	10.1	10.0	9.9	11.0	9.9	9.3	10.2	8.3 ^c	9.3	9.9	9.9	11.1	9.8	11.2
リンゴ酸 (10 mg/200 mL)	10.1	9.5	10.7	9.6	10.4	9.1	10.4	9.9	10.2	10.8	9.9	9.3	10.0	12.1 ^{a,c}	8.9	10.4	10.6	10.7	9.6	11.2
試験3	26.7	25.9	26.5	25.5	26.8	23.2	25.7	25.3	26.5	27.9	26.4	24.0	24.3	16.9 ^{b,c}	31.1	26.2	27.5	27.4	26.9	27.5
マロン酸 (30 mg/200 mL)	26.5	27.0	26.3	26.4	26.5	23.6	25.8	23.0	28.1	27.3	26.0	23.8	24.8	13.4 ^{b,c}	30.7	26.0	27.4	25.4	27.2	27.6
試験4	21.1	17.9	20.3	19.7	19.8	20.2	19.7	18.6	19.2	15.2	18.0	19.7	20.2	8.7 ^{b,c}	19.4	20.8	20.4 ^c	20.7	18.3	19.5
DINCH (20 mg/200 mL)	20.8	15.6	20.1	19.4	20.0	20.8	18.8	19.2	20.4	15.9	18.7	19.4	20.1	14.8 ^c	19.8	19.5	27.3 ^{a,c}	20.6	16.9	20.1
試験5	19.3	17.1	17.3	10.8	16.7	9.8	15.3	15.3	10.5	11.1	15.8	11.0	16.1	0.5	17.1	18.8	19.6	19.0	4.5 ^{c,*}	4.8
ATBC (20 mg/200 mL)	19.7	10.1	17.8	10.0	13.6	6.0	17.4	14.7	17.2	13.2	17.3	9.1	15.1	1.3	17.1	17.8	18.5	19.6	15.7 ^{c,*}	8.2
試験6	11.0	12.7 ^{a,c}	9.8	9.9	9.8	10.3	8.9	9.3	9.4	8.8	7.7	10.5	10.0	4.5 ^b	9.9	10.3	10.4	10.5	9.0	10.0
DEHTP (10 mg/200 mL)	11.0	8.7 ^c	9.9	10.1	9.8	11.2	9.5	13.1 ^{a,*}	10.2	10.9	9.1	13.6 ^a	10.1	6.8	9.8	10.0	13.3 ^a	10.6	9.6	10.0

^a : 残留物量が明らかに多い結果

^b : 残留物量が明らかに少ない結果

^c : 残留物量の 2 試行の差が明らかに大きい結果

* : 試料配布時の容器のシーリングに異常が見られた

表 4 試験室間共同試験の解析結果

試料名 (初期試料量)	総溶出物試験			蒸発残留物試験		
	残留物平均値 (mg)	RSD _F (%)	RSD _R (%)	残留物平均値 (mg)	RSD _F (%)	RSD _R (%)
試験1	7.8	13.1	48.7	-	-	-
TriEG (12 mg)	(9.5)	(10.5)	(17.9)	-	-	-
試験2	10.0	6.6	7.3	8.7	7.7	24.3
リンゴ酸 (10 mg)	(10.0)	(2.7)	(6.1)	(9.3)	(5.1)	(6.8)
試験3	25.8	3.2	11.8	19.6	15.6	38.1
マロン酸 (30 mg)	(26.3)	(2.4)	(6.5)	(20.0)	(11.4)	(36.3)
試験4	19.1	8.1	13.9	18.4	3.2	7.7
DINCH (20 mg)	(19.3)	(3.2)	(7.6)	(18.6)	(2.8)	(6.7)
試験5	13.7	19.1	38.0	-	-	-
ATBC (20 mg)	(13.9)	(14.3)	(36.8)	-	-	-
試験6	10.0	12.5	16.1	9.0	4.8	16.0
DEHTP (10 mg)	(9.9)	(5.5)	(7.4)	(9.2)	(4.7)	(7.6)

残留物量が 0.5 mg 未満であった結果は残留物量を 0.5 mg として残留物平均値、RSD_F (併行精度) および RSD_R (室間再現精度) を算出 () 内の値は、一部の結果を棄却し、再解析した場合の値

4～6では蒸発皿を用いており、ビーカーと蒸発皿のいずれの容器についても予備試験を行い、両方で目標値を満たしていることを確認した。容器の材質については、17試験所がガラスであり、その他の3試験所では石英製（試験所L）、白金製（試験所M）、アルミ製（試験所O）であった。

3) 総溶出物試験の結果

試験室間共同試験により算出した性能パラメーターを表4に示した。

①試料1の結果

試料1は試験溶液200 mL中にTriEGを12 mg含む試料であり、各試験所から得られた残留物の平均値は7.8 mg、RSD_rは13.1%、RSD_Rは48.7%であった。図1に示すように、残留物量が1.1 mg以下となった結果が7つ（試験所F、M、N、およびS）存在し、これらは他の試験所の残留物量から明らかに乖離していた。そのためこれらを「b 残留物量が明らかに少ない」に該当すると判断した。さらに、「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」が1つ（試験所S）存在した。そこで、これらに該当する4試験所のデータを棄却して再解析した結果、残留物の平均値は9.5 mg、RSD_rは10.5%、RSD_Rは17.9%となった。これら4試験所では大部分のTriEGが揮散しており、特に試験所Mにおいては、予備試験により乾燥器の設定温度を80°Cに設定したにもかかわらず、ほぼすべてのTriEGが揮散していた。今後、その原因を究明することが試験所間における結果の平準化の一助となると考えられた。

②試料2の結果

試料2は試験溶液200 mL中にリンゴ酸を10 mg含む試料であり、各試験所から得られた残留物の平均値は10.0 mg、RSD_rは6.6%、RSD_Rは7.3%であった。図2に示すように、「a 残留物量が明らかに多い結果」および「c 残留物量

の2試行の差が明らかに大きい結果」が1つ（試験所N）存在した。これに該当する試験所のデータを棄却して再解析した結果、残留物の平均値は10.0 mg、RSD_rは2.7%、RSD_Rは6.1%となった。

昨年度行った蒸発残留物試験の結果（平均値：8.7 mg、RSD_r：7.7%、RSD_R：24.3%）と比較したところ（表4）、総溶出物試験では残留物量が増加し、RSD_rおよびRSD_Rが小さくなった。このことから、総溶出物試験ではリンゴ酸の揮散が抑制されたことにより、試験所間における残留物量のばらつきが抑えられたと考えられた。

③試料3の結果

試料3は試験溶液200 mL中にマロン酸を30 mg含む試料であり、各試験所から得られた残留物の平均値は25.8 mg、RSD_rは3.2%、RSD_Rは11.8%であった。図3に示すように、試料3の残留物量では他の試験所の結果から乖離したものが2つ存在した。これらを「b 残留物量が明らかに少ない」に該当すると判断した。さらにこれらは「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」にも該当したため、この試験所（試験所N）のデータを棄却して再解析した結果、残留物の平均値は26.3 mg、RSD_rは2.4%、RSD_Rは6.5%となった。

昨年度に行った蒸発残留物試験の結果（平均値：19.6 mg、RSD_r：15.6%、RSD_R：38.1%）と比較したところ（表4）、試料2と同様に残留物量が増加し、RSD_rおよびRSD_Rが小さくなった。したがって、マロン酸においてもアルミ箔の蓋により揮散が抑制され、試験所内における残留物のばらつき（RSD_r）や、試験所間における残留物量のばらつき（RSD_R）が抑えられたと考えられた。

④試料4の結果

試料4は、試験溶液200 mL中にDINCHを20 mg含む試料であり、各試験所から得られた

残留物の平均値は 19.1 mg、 RSD_r は 8.1%、 RSD_R は 13.9%であった。図 4 に示すように、試料 4 の残留物量では「a 残留物量が明らかに多い結果」が 1 つ（試験所 Q）存在した。さらに、他の試験所よりも明らかに少ない結果が 1 つ（試験所 N）存在し、これを「b 残留物量が明らかに少ない」に該当すると判断した。これらは「c 残留物量の 2 試行の差が明らかに大きい結果」にも該当したため、これら 2 試験所のデータを棄却して再解析した結果、残

留物の平均値は 19.3 mg、 RSD_r は 3.2%、 RSD_R は 7.6%となった。この棄却後の性能パラメーターは、昨年度に行った蒸発残留物試験の結果（平均値：18.6 mg、 RSD_r ：2.8%、 RSD_R ：6.7%）とほぼ同程度であった（表 4）。DINCH は蒸発残留物試験においても比較的揮散しにくい物質であり、各試験所の残留物量が蒸発残留物試験と同程度の値であったためと考えられた。

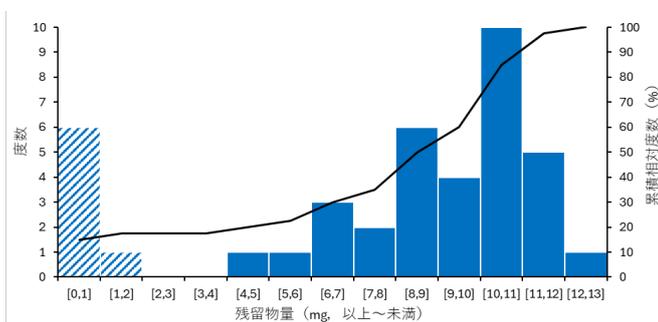


図 1 試料 1 の結果として報告された残留物量のヒストグラム

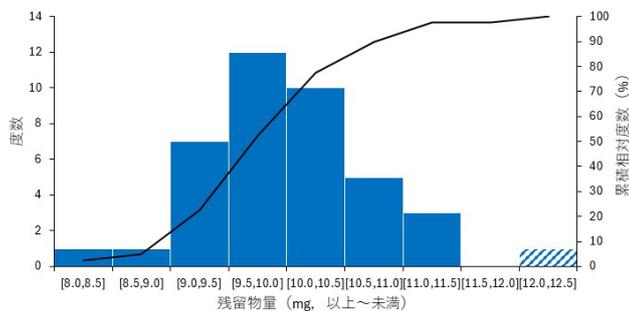


図 2 試料 2 の結果として報告された残留物量のヒストグラム

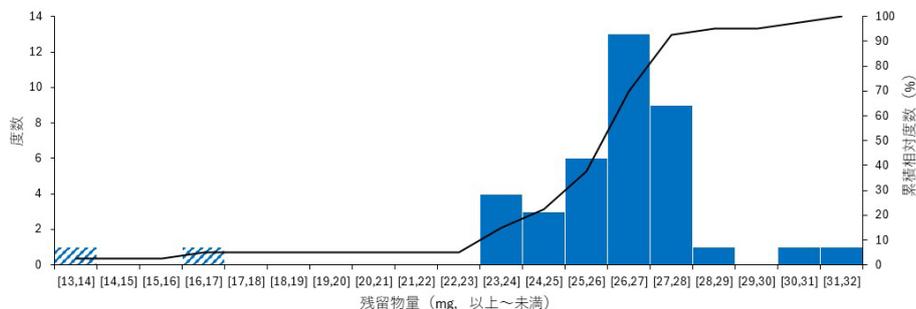


図 3 試料 3 の結果として報告された残留物量のヒストグラム

⑤試料5の結果

試料5は、試験溶液200 mL中にATECを20 mg含む試料であり、各試験所から得られた残留物の平均値は13.7 mg、 RSD_r は19.1%、 RSD_R は38.0%であった。図5に示すように、試料5の残留物量は他の試料と比べて残留の程度が試験所によって大きく異なり、結果がばらついていた。また、「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」に該当するものが1つ（試験所S）存在したが、他にも2試行の差がやや大きい試験所が散見された（ただし、試験所Sについては、試料配布時の容器のシーリングに異常が見られたとの報告があった）。

「c 残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」に該当した試験所のデータを棄却して再解析した結果、残留物の平均値は13.9 mg、 RSD_r は14.3%、 RSD_R は36.8%であり、棄却前と同程度であった。ATECは主にポリ塩化ビニルやポリ塩化ビニリデンの可塑剤として使用される添加剤であり、数～数十%添加される場合がある。そのため、ATECのような物質を多く含む試験溶液では、試験所によって適否判定の結果が異なる可能性があった。今後、このような試験溶液の結果を平準化するための方策を検討する必要があると考えられた。

⑥試料6の結果

試料6は、試験溶液200 mL中にDEHTPを10 mg含む試料であり、各試験所から得られた残留物の平均値は10.0 mg、 RSD_r は12.5%、 RSD_R は16.1%であった。図6に示すように、試料6の残留物量では「a 残留物量が明らかに多い結果」が4つ（試験所B、H、L、およびQ）存在した（ただし、試験所Hについては、試料配布時の容器のシーリングに異常が見られたとの報告があった）。さらに、残留物量が極端に少ない結果が1つ（試験所N）存在し、これを「b 残留物量が明らかに少ない」に該当すると判断した。また、「c 残留物量の2試行

の差が明らかに大きい結果」に該当するものが1つ（試験所B）存在した。これらに該当する5試験所のデータを棄却して再解析した結果、残留物の平均値は9.6 mg、 RSD_r は6.9%、 RSD_R は13.6%となった。この棄却後の性能パラメーターは、昨年度に行った蒸発残留物試験の結果（平均値：9.2 mg、 RSD_r ：4.7%、 RSD_R ：7.6%）とほぼ同程度であった（表4）。DEHTPは試料4のDINCHと同様に蒸発残留物試験においても比較的揮散しにくい物質であり、各試験所の残留物量が蒸発残留物試験と同程度の値であったためと考えられた。

⑦結果の考察

令和4年度の試験室間共同試験³⁾において一部、又は大部分が揮散する傾向にあった物質（試料2、3、4、および6）は、総溶出物試験においては規格試験法として十分な性能を有することが示された。特に、試料3は蒸発残留物試験において大部分が揮散した物質であり、試験所間の残留物量が大きくばらついていた物質であったが、総溶出物試験では試験所間で残留物量のばらつきが小さくなった。したがって、総溶出物試験における試験操作によって蒸発残留物試験の課題点が解消され、試験精度が大きく改善した。また、蒸発残留物試験において残留率が低かった試料1や5は総溶出物試験で半数以上の試験所において50%以上の残留率を示した。このことから、総溶出物試験は蒸発残留物試験では対象とならない揮発性の大きい物質も対象にできると考えられた。以上のことから、指標物質を用いて試験所間の乾燥条件を平準化する操作は試験所間の試験結果のばらつきを抑制するために有用であり、さらに、アルミニウム箔で蓋を行う操作を取り入れた総溶出物試験は、蒸発残留物試験と比べて試験対象となる物質の範囲が広く、器具・容器包装からの溶出物を包括的に測定する試験法として適切であると

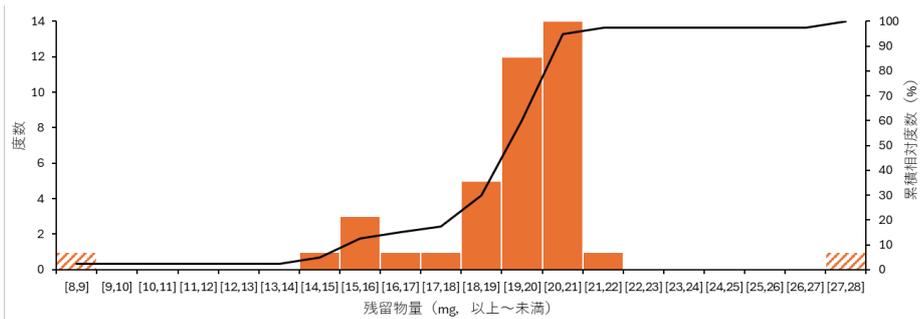


図4 試料4の結果として報告された残留物量のヒストグラム

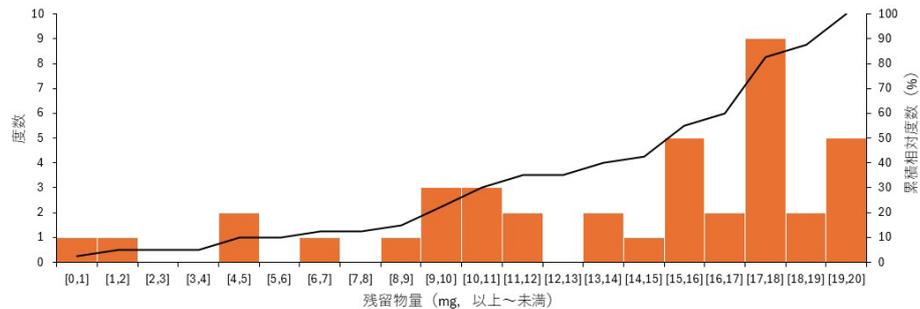


図5 試料5の結果として報告された残留物量のヒストグラム

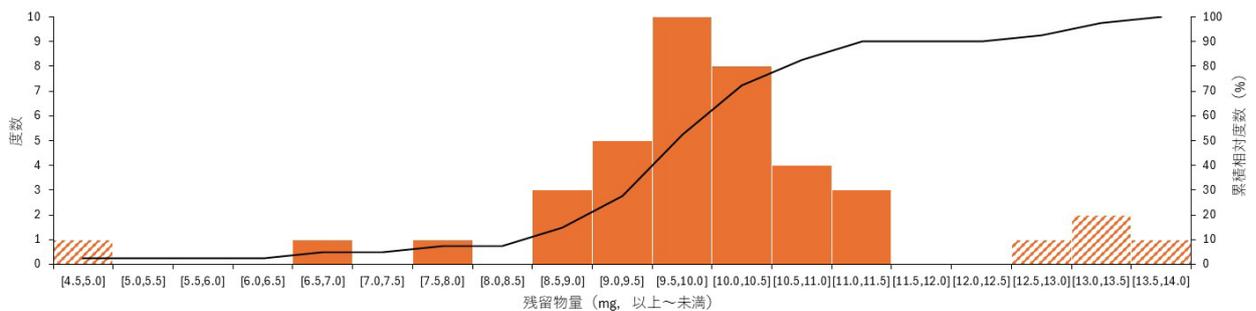


図6 試料6の結果として報告された残留物量のヒストグラム

考えられた。

一方で、「a残留物量が明らかに多い結果」、「b 残留物量が明らかに少ない結果」および「c残留物量の2試行の差が明らかに大きい結果」に該当する結果が散見された。特に試料1および6では、これらに該当する結果が多くみられた。ただし、試料4および6では、一部の試験所から試料配布時のガラス瓶の蓋のシーリングに異常が見られたとの報告があったことから、ヘプタン溶液である試料4～6では、シーリングに含まれていた物質が試料に混入した可能性や、ガラス瓶の密封性が不十分となっていた可能性があった。さらに、昨年度の蒸発残留物試験の結果と比べて残留物量が減少していた結果も存在した。総溶出

物試験では新たな操作としてアルミニウム箔で蓋をする操作を追加したため、蓋の付け具合や穴の空け具合等の操作に対する熟練度が結果のばらつきに関与している可能性が考えられた。また、試料5のように試験所間で残留物量が大きくばらつく物質が存在することもあり、今後その原因を究明し、試験所間における結果を平準化するための方策を検討する必要があると考えられた。

D. 結論

器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験対象物質の範囲拡大と精度の改善を目的として総溶出物試験を考案した。総溶出物試験について、民間の登録検査機関、公的な衛

生研究所など計 20 試験所による試験室間共同実験を行い、その性能を検証した。

試験室間共同試験に先立ち、各試験所は指標物質として TetEG を用いた予備試験を行い、乾燥条件の調節を自ら行った。各試験所が自ら調節した乾燥条件で総溶出物試験を行った結果、蒸発残留物試験と同等以上の性能を有することが示唆されたが、一部の物質では試験所間での残留物量のばらつきが大きく、試験所によって結果が大きく異なる可能性があることが判明したことから、今後その原因を究明し、試験所間における結果を平準化するための方策を検討する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 201 号、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部改正（平成 18 年 3 月 31 日）
- 2) 河村葉子、器具・容器包装の規格基準とその試験法（ISBN4-8058-2663-0）、中央法規、p 34–36（2006）
- 3) 令和 4 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 食品用器具・容器包装等の衛生的な製造管理等の推進に資する研究 総括・分担研究報告書、p 55–77（2023）
- 4) 平成 30 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 食品用器具・容器包装等に使用される化学物質に関する研究 総括・分担研究報告書、p 13–21（2019）

<別添>

令和5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

市販製品に残存する化学物質に関する研究

総溶出物試験法

共同実験プロトコル

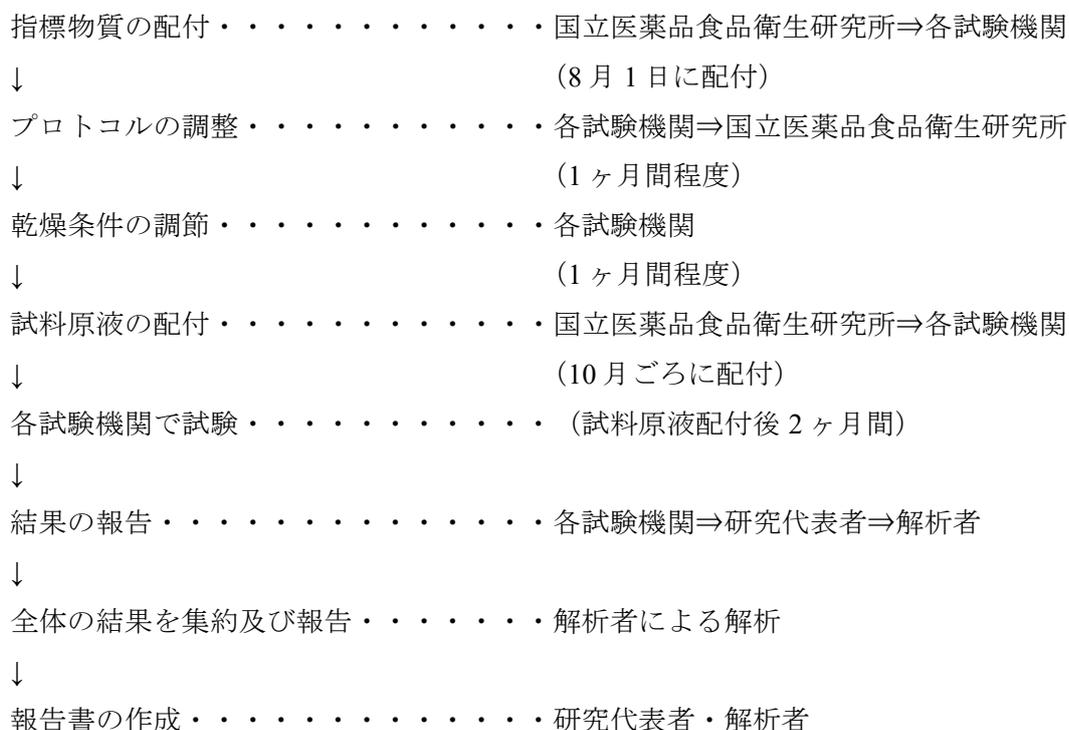
令和5年9月1日

A 目的

これまでに蒸発残留物試験に関する検討を種々行ってきたが、使用する容器の形状や乾燥器の送風方式の違いなどによって各試験所間での試験結果に差が生じることを明らかにしてきた。令和4年度における検討ではこれらの問題を解決するために欧州連合における Overall migration testing を参考として総不揮発性物質試験を考案し、その性能を検証した。その結果、揮発性の乏しい試料では各試験所間での結果に大きな差が認められなかったものの、揮発性の高い試料では各試験所間での結果に大きな差が認められ、総不揮発性物質試験を規格試験法として運用するためにはさらなる改善が必要であると考えられた。

そこで令和5年度の共同試験では、試験結果に差が生じる主な要因と考えられる 105°C 2 時間の乾燥条件について、以前の検討で性能の向上に有効性が確認されたアルミニウム箔の蓋を使用するとともに、「指標物質」を用いて平準化することとした「総溶出物試験法」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。

B スケジュール



C 試験の実施に関する注意事項

- 1) 蒸発残留物試験及び総不揮発性物質試験は、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) 試料原液は、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) 試料原液または試料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) 試験の実施は特段の理由がない限り、1つの試料原液につき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、下記の連絡先にe-mailにて提出すること。

蒸発残留物試験法プロトコル

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。
- ・エタノール（99.5）：JIS K8101、特級*¹
- ・アセトン：JIS K8034、特級*¹
- ・ヘプタン：JIS K9701、特級*¹
- ・20%エタノール：エタノール（99.5）200 mLを量り、水を加えて1000 mLとする。*²
- ・テトラエチレングリコール：国衛研から配布したもの

*¹：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：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. 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。

- ・白金製、石英製または耐熱ガラス製等の蒸発皿*¹
- ・デシケーター
- ・電子天秤（最小表示が0.1 mg以下であるもの）
- ・水浴*²
- ・ホットプレート
- ・乾燥器または恒温槽

*¹：蒸発皿は、結晶皿、ビーカー等で代用可能

*²：水浴は、ホットプレートで代用可能

3. 試料

テトラエチレングリコール（TEG）100 mg にアセトンを加えて 50 mL とし、これを指標試料とする（濃度：2 mg/mL）。*¹

試料原液 12 種（20%エタノール溶液 6 種、ヘプタン溶液 6 種）各 1 試験、計 12 試験*²

試料原液 2 mL を採取し、試料原液と同じ溶媒を加えて 200 mL とし、これを試料とする。試料調製後は速やかに試験を実施する。^{*3}

*1：テトラエチレングリコールは吸湿性があるので、できるだけ速やかに秤量する。

*2：試料原液は試験実施までの間は冷蔵庫内で保存し、室温まで戻したのちに使用する。

*3：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。

4. 試験

1) 乾燥条件の調節

指標試料 5 mL を、あらかじめ 105°C で乾燥した質量既知（秤量①）の白金製、石英製又は耐熱ガラス製等の蒸発皿に採り（n=5）、60～80°C に設定したホットプレートで 30～60 分間加温してアセトン除去する^{*1}。デシケーター内で放冷後、アルミニウム箔を取り除き、秤量（秤量②）して操作前後の蒸発皿の質量差 I_0 (mg) を求め、質量差 I_0 が 9.0～11.0 mg の範囲内であることを確認する。質量差 I_0 が 11.0 mg を超える場合は、質量差 I_0 が 9.0～11.0 mg の範囲内となるまで 30～60 分間の加温を繰り返す。 I_0 が 9.0 mg を下回る場合は、改めて最初の操作から行う。

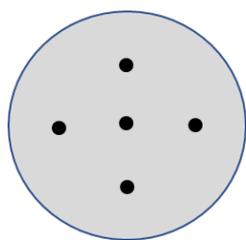
$$\text{「質量差 } I_0 \text{」} = \text{「秤量②」} - \text{「秤量①」}$$

次いで、この蒸発皿にアルミニウム箔で蓋（図 1 を参考に穴を 5 ヶ所空ける）をして、乾燥器または恒温槽内で 105°C で 2 時間乾燥させた後、デシケーター中で放冷する。冷後、アルミニウム箔を取り除き、秤量（秤量③）して操作前後の蒸発皿の質量差 I_1 (mg) を求める。別に空試験として同様に 105°C で 2 時間の乾燥操作を行った蒸発皿の質量差 B_1 (mg) を求め、次式により残留量 R_1 (mg) を求める。

残留量 R_1 の平均値 (mg) と相対標準偏差 RSD (%) を求め、残留量 R_1 (n=5) の平均値が 7.0～9.0 mg、RSD が 15.0% 以下であることを確認する。いずれかの条件を満たさないときは、以下を参考に乾燥条件を変更して、両条件を満たすまで同様の操作を繰り返す。両条件を満たす条件を乾燥条件として設定する。

$$\text{「残留量 } R_1 \text{」} = \text{「指標試料用蒸発皿の質量差 } I_1 \text{」} - \text{「空試験の質量差 } B_1 \text{」}$$

$$\text{「質量差 } I_1 \text{」} = \text{「秤量③」} - \text{「秤量①」}$$



- ・アルミニウム箔は容器外壁に密着させるように被せる
- ・穴は円心、円心と円周の midpoint×4 の 5 か所に串等で空ける（直径 1 mm 程度）
- ・秤量時はアルミニウム箔を取り外す

図1 アルミニウム箔の穴の明け方

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <残留量 R_1 の平均値が 7.0 mg 未満の場合> | <残留量 R_1 の平均値が 9.0 mg を超える場合> |
| ・乾燥器の温度を下げる（100℃ など） | ・乾燥器の温度を上げる（110℃ など） |
| ・ビーカー等の深い容器を用いる | ・結晶皿等の浅い容器を用いる |
| ・自然対流方式の乾燥器を用いる | ・強制送風方式の乾燥器を用いる |

<残留量 R_1 の相対標準偏差RSDが15.0%を超える場合>

- ・強制送風方式の乾燥器を用いる
- ・ビーカー等の深い容器を用いる
- ・乾燥器内の容器の置き場所を変える

*1：アセトンは短時間で揮散するが、TEGが吸湿した水分を完全に除去するためには30～60分間の加熱が必要である。80℃で30分間または60℃で60分間を推奨（適切な設定温度と時間は加熱装置の性能によるが、100℃で60分間加熱すると10%程度のTEGが揮散してしまうので注意）。

2) 本試験

試料 200 mL を、あらかじめ 105℃ で乾燥した質量既知（秤量④）の白金製、石英製又は耐熱ガラス製等の蒸発皿に採り、水浴上で蒸発乾固する。次いで、アルミニウム箔で蓋（図1）をして、1) で設定した乾燥条件で2時間加熱した後、デシケーター中で放冷する。冷後、アルミニウム箔を取り除き、秤量（秤量⑤）して操作前後の蒸発皿の質量差 S_2 (mg) を求める。別に空試験として試料と同量の溶媒を用いて同様の操作を行った蒸発皿の質量差 B_2 (mg) を求め、次式により残留物の量 R_2 (mg) を求める。

$$\begin{aligned} \text{「残留物量 } R_2 \text{」} &= \text{「試験用蒸発皿の質量差 } S_2 \text{」} - \text{「空試験用蒸発皿の質量差 } B_2 \text{」} \\ \text{「質量差 } S_2 \text{」} &= \text{「秤量⑤」} - \text{「秤量④」} \end{aligned}$$

3) 追加試験（乾燥条件の温度が105℃でない場合のみ）

試料200mLを、あらかじめ105℃で乾燥した質量既知（秤量⑥）の白金製、石英製又は耐熱ガラス製等の蒸発皿に採り、水浴上で蒸発乾固する。次いで、アルミニウム箔で蓋をして、105℃2時間加熱した後、デシケーター中で放冷する。冷後、アルミニウム箔を取り除き、秤量（秤量⑦）して操作前後の蒸発皿の質量差 S_3 (mg) を求める。別に空試験として試料と同量の溶媒を用いて同様の操作を行った蒸発皿の質量差 B_3 (mg) を求め、次式により残留物の量 R_3 (mg) を求める。

$$\begin{aligned} \text{「残留物量 } R_3 \text{」} &= \text{「試験用蒸発皿の質量差 } S_3 \text{」} - \text{「空試験用蒸発皿の質量差 } B_3 \text{」} \\ \text{「質量差 } S_3 \text{」} &= \text{「秤量⑦」} - \text{「秤量⑥」} \end{aligned}$$

5. 留意事項等

- 蒸発皿は、結晶皿、ビーカー等で代用可能とする。
- 蒸発皿は、1) で用いた容器と同様の容器を2)～3) においても使用する。
- ヘプタン溶液の場合は、数mLまで減圧濃縮し、その濃縮液及び使用したフラスコをヘプタン約5mLずつで2回洗った洗液を蒸発皿に移して蒸発乾固してもよい。
- 水浴は、ホットプレートで代用可能とする。
- 蒸発乾固を行う際、水浴やホットプレートの温度は試験環境に応じて適宜変更してよい。
- 蒸発乾固後は速やかに加熱をやめる。（蒸発乾固する直前に加熱をやめ、容器の余熱で蒸発乾固させる。）
- 空試験（n=1）は試料原液の希釈に使用した溶媒を用いて行う。
- 空試験の蒸発皿は、同一溶媒の試料に対して共用可とする。
- 空試験の蒸発皿の秤量は実試験の蒸発皿の秤量と連続して行う。
- 加熱時や放冷時において、空試験の蒸発皿にもアルミニウム箔で蓋をする。
- 蒸発皿の質量は0.1 mgの桁まで測定する。

参考：放冷時間は、使用する蒸発皿等の材質や形状、試験室の温度などによって異なるが、ガラス製結晶皿（直径 7cm、高さ 3.5cm）9 個をデシケーター内で 1 時間程度放置すると室温となる。

6. 結果の考察

- 追加試験の結果と昨年度の結果の比較により、アルミニウム箔の蓋による効果を検証
- 本試験と追加試験の結果の比較により、指標物質による乾燥条件の平準化の効果を検証
- 本試験の結果と昨年度の結果の比較により、現行法と改良法の性能を比較

【参考】具体的な操作手順

1) 乾燥条件の調節

- ①容器 6 個を 105°C で乾燥して秤量 (5 個を試験、1 個を空試験) (秤量①)
- ②容器に指標試料 (TEG : 2 mg/mL) 5 mL を加える
- ③60~80°C で 30~60 分間加温
- ④デシケーター中で放冷
- ⑤容器を秤量【操作前後の蒸発皿の質量差 I_0 : 9.0~11.0 mg】☆ (秤量②)
- ⑥☆の条件を満たさない場合は③~⑤を繰り返す (9.0 mg 未満となった場合は②~⑤を繰り返す)
- ⑦アルミニウム箔で蓋をして、105°C (◇) で 2 時間加熱
- ⑧デシケーター中で放冷
- ⑨アルミニウム箔を取り除いて容器を秤量【平均値 : 7.0~9.0 mg、RSD : 15%以下】★ (秤量③)
- ⑩★の条件を満たさない場合は、容器、乾燥器、乾燥器の設定温度 (◇) を変えて①~⑨を繰り返す。
- ⑪★の条件を満たした容器、乾燥器、乾燥器の設定温度を乾燥条件 (◆) とする。

2) 本試験

- ①容器を 105°C で乾燥して秤量 (+ 空試験 1 個) (秤量④)
- ②試料 200 mL を加え、蒸発乾固
- ③アルミニウム箔で蓋をして、設定した乾燥条件 (◆) で 2 時間加熱
- ④デシケーター中で放冷
- ⑤アルミニウム箔を取り除いて容器を秤量 (秤量⑤)

3) 追加試験 (乾燥条件の温度が 105°C の場合は不要)

- ①容器を 105°C で乾燥して秤量 (+ 空試験 1 個) (秤量⑥)
- ②試料 200 mL を加え、蒸発乾固
- ③アルミニウム箔で蓋をして、105°C で 2 時間加熱
- ④デシケーター中で放冷
- ⑤アルミニウム箔を取り除いて容器を秤量 (秤量⑦)

以上

R5「改良蒸発残留物試験」結果報告シート1

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	○○○○
	e-mail	……@……

2. 使用した機器

機器 *1	メーカー	型式	開示の可否 *2	
天秤			可	
水浴			可	
ホットプレート				
乾燥機又は恒温槽				
エバポレーター				

3. 使用した試薬等

試薬	メーカー	Grade	純度 (%)または濃度
アセトン	シグマ-アルドリッチ	特級	> 99.5%
エタノール	シグマ-アルドリッチ	特級	> 99.5%
ヘプタン	和光純薬	特級	98%
水			

4. 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

R5「総溶出物試験」予備試験結果報告シート

試験所名

検討	種類	容器			アセトン除去		乾燥操作		n	秤量値			乾燥前		乾燥後 質量差 I ₁ (mg)	TEG 残存量 R ₁ (mg)	残存量		備考 (気になった点や操作の詳細など)
		材質	高さ (cm)	直径 (cm)	容量 (mL)	加温装置	設定温度 (°C)	加温時間 (分)		対流	設定温度 (°C)	試験前 秤量① (mg)	アセト>除去後 秤量② (mg)	乾燥操作後 秤量③ (mg)			質量差 I ₀ (mg)	9.0~11.0	
Ex	結晶皿	ガラス	3.6	6.5	70	ホットプレート	60	強制送風	105	空	54117.3	54117.3	54117.3	0.00	7.0~9.0	-	-	O列 (7>除去後の秤量値)は、Q列が9.0~11.0mgとなった時の値のみを記入。 加温を追加した場合は、J列 (加温時間)には合計時間を記入。	
										1	54117.3	54127.8	54124.1	10.50	6.80	-			
										2	54026.9	54037.8	54035.4	10.90	8.50	-			
										3	53577.4	53588.3	53586.1	10.90	8.70	-			
										4	53519.9	53530.8	53528.2	10.90	8.30	-			
5	53351.0	53361.8	53359.1	10.80	8.10	-													
1									空				0.00	-	-	#DIV/0!			
									1				0.00	0.00	-				
									2				0.00	0.00	-				
									3				0.00	0.00	-				
									4				0.00	0.00	-				
2									空				0.00	-	-	#DIV/0!			
									1				0.00	0.00	-				
									2				0.00	0.00	-				
									3				0.00	0.00	-				
									4				0.00	0.00	-				
3									空				0.00	-	-	#DIV/0!			
									1				0.00	0.00	-				
									2				0.00	0.00	-				
									3				0.00	0.00	-				
									4				0.00	0.00	-				
4									空				0.00	-	-	#DIV/0!			
									1				0.00	0.00	-				
									2				0.00	0.00	-				
									3				0.00	0.00	-				
									4				0.00	0.00	-				
5									空				0.00	-	-	#DIV/0!			
									1				0.00	0.00	-				
									2				0.00	0.00	-				
									3				0.00	0.00	-				
									4				0.00	0.00	-				

R5「総溶出物試験」 結果報告シート2-1

試験所名

20%エタノール

1. 試験条件

容器の種類、材質、サイズ、容量	ガラス製ビーカー（直径：○cm、高さ：○cm、容量：○mL）
水浴（ホットプレート）の設定温度	ホットプレート、120℃
乾燥器の送風方式	自然対流 or 強制送風
乾燥器の設定温度	105℃
エバポレーターの使用の有無	なし

2. 秤量値

試料番号	秤量値 (mg)		質量差 S ₂ (mg)	残留物の量 R ₂ (mg)
	試験前④	試験後⑤		
空試験	xxxxx.x	xxxxx.x	#VALUE!	—
試料 1			0.0	#VALUE!
試料 2			0.0	#VALUE!
試料 3			0.0	#VALUE!
試料 4			0.0	#VALUE!
試料 5			0.0	#VALUE!
試料 6			0.0	#VALUE!

3. その他

気になった点、試験中のトラブルなど