

図4 Cosmosil 2.5 π NAP カラムを用いた可塑剤混合標準溶液 (0.5 μ g/mL) のトータルイオンクロマトグラム (SIR)

(): 保持時間 (min); 測定イオンは図2と同じとした。

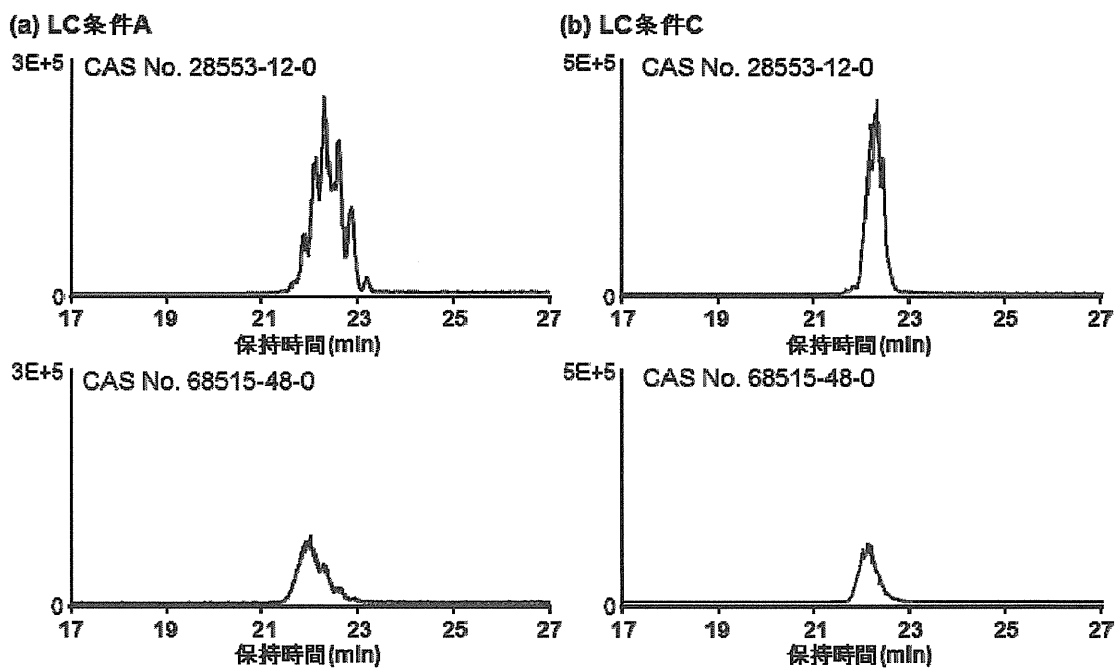


図5 CAS No. が異なる DINP (各 50 ng/mL) の MRM クロマトグラム (419 > 149)

表5 LC/MS/MS 測定における共存可塑剤の影響

共存可塑剤	LC 条件	DBP	BBP	DEHP	DNOP	DINP	DIDP
DIBP	A	<u>> 1200</u>	<u>67</u>	95	102	99	101
	C	<u>> 1200</u>	<u>99</u>	-	-	91	94
	D	<u>101</u>	<u>105</u>	-	-	-	-
DEHA	A	99	100	<u>80</u>	95	97	95
	B	102	96	<u>97</u>	101	100	102
DINA	A	97	103	97	96	<u>58</u>	93
	C	102	102	-	-	<u>96</u>	96
ATBC	A	100	<u>101</u>	96	99	99	97
	C	99	<u>64</u>	-	-	100	98
	D	99	<u>100</u>	-	-	-	-
TBC	A	102	100	98	101	98	100
DEHIP	A	103	102	98	98	99	97
DEHTP	A	102	103	100	98	98	103
DINCH	A	100	101	96	102	97	<u>73</u>
	C	104	105	-	-	80	<u>102</u>

数値は共存可塑剤が存在しないときのピーク面積値に対する共存可塑剤が存在するときのピーク面積値の割合(%), -: 分離できないため計算しなかった

全て定量可能であることが確認された。また、DEHA 共存時には条件 B により DEHP を定量可能であった。また、DEHTP は DIDP と保持時間が重なっていたが (図 2 (a))、イオン化しにくいため大量に存在していても定量には影響がないことが明らかとなった。

さらに DIBP 共存時の BBP、DINA 共存時の DINP、DINCH 共存時の DIDP は InertSustain Phenyl HP カラムの条件 C により、DIBP 共存時の DBP および BBP、ATBC 共存時の BBP は Cosmosil 2.5 π NAP カラムの条件 D で定量可能であることが確認された。

したがって、LC/MS/MS を用いて 6 種のフタル酸エステルを測定するときは、初めに Acquity HSS T3 の条件 A で測定し、含有されている可塑剤の定性を行うとともに、6 種のフタル酸エステルのうち共存可塑剤の影響がないものについては定量も行う。また、DBP と BBP、DINP と DINA、DIDP と DEHTP または DIDP と DINCH がともに検出された場合は InertSustain Phenyl HP カラムを用いた条件 C により定量を行い、DBP と DIBP、BBP と ATBC がともに検出された場合は Cosmosil 2.5 π NAP

カラムを用いた条件 D により定量を行うこととした。

ただし、製品には可塑剤の他にも酸化防止剤や紫外線吸収剤などの添加剤が含有されているため、これらの添加剤に由来するピークが検出され 6 種のフタル酸エステルのピークと重複する場合には、分離についてさらなる条件検討が必要である。

3) 検量線および定量下限

標準溶液を用いて 6 種のフタル酸エステルの検量線を作成した。図 6 に Acquity HSS T3 カラムの条件 A を用いたときの検量線を示した。DBP および DIDP が 0, 5~75 ng/mL、BBP が 0, 2.5~50 ng/mL、DEHP および DINP が 0, 5~100 ng/mL、DNOP が 0, 5~50 ng/mL の濃度範囲で良好な相関係数が得られた ($r > 0.999$)。

また、6 種のフタル酸エステルを添加していない 0 ng/mL の標準溶液において DBP、DEHP、DINP および DIDP のピークが確認された (図 7)。そのため、移動相およびカラムの交換、LC システムおよびイオン源の洗浄を行ったが、完全に除去することはできなかった。フタル酸エステルは環境中に広く存在しており、

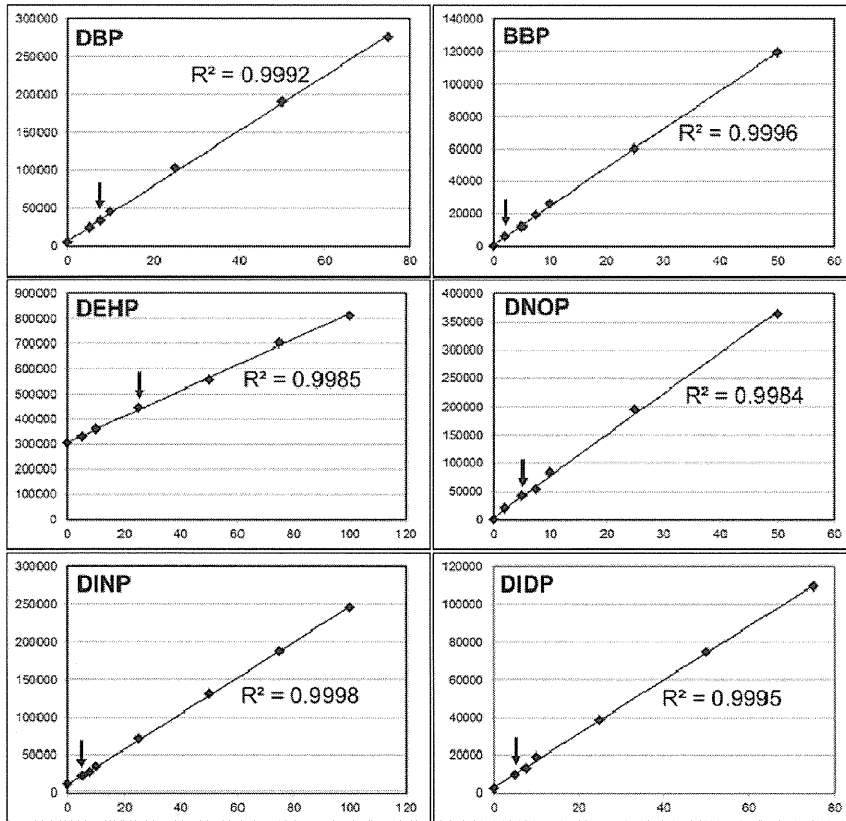


図6 6種のフタル酸エステルの検量線(LC条件A)
↓は定量下限を示した。

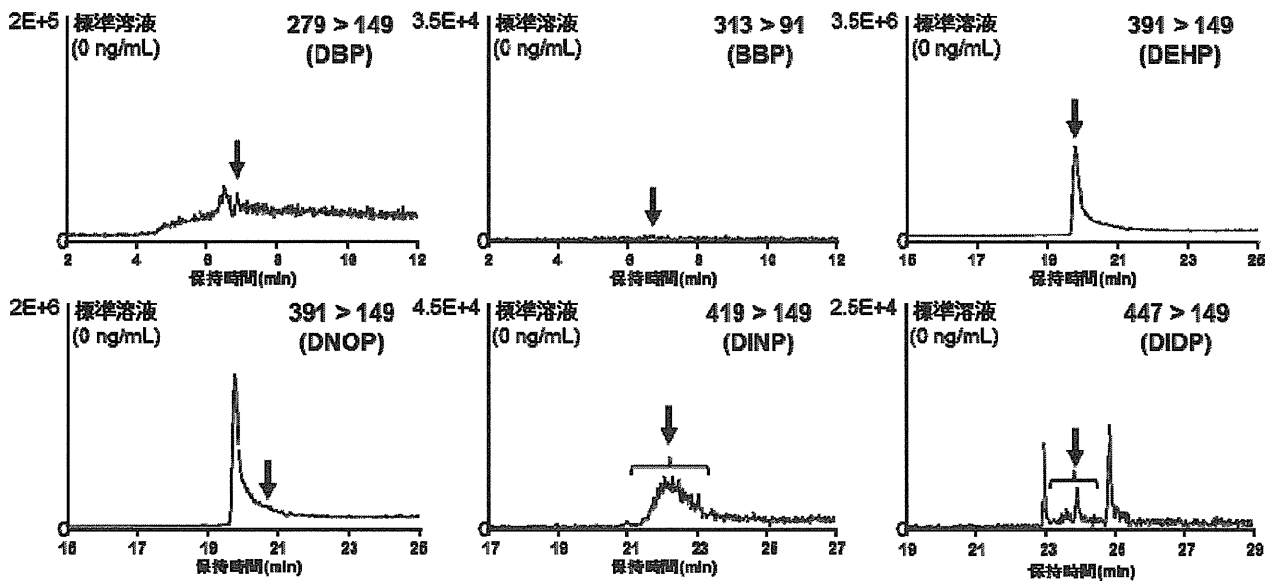


図7 6種のフタル酸エステルを添加していない標準溶液(0 ng/mL)のMRMクロマトグラム(LC条件A)

装置類に吸着しやすいため、繰り返し測定するうちに機器が汚染されたと推測された。

そこで本研究における各フタル酸エステルの定量下限は、0~100 ng/mL の標準溶液を繰り返し 5 回測定し、0 ng/mL の標準溶液における各フタル酸エステルの定量イオンの面積値の平均値に、標準偏差 (SD) の 10 倍を加えた値 (「平均値+10×SD」) 以上の面積値の濃度とした。表 6 に LC/MS/MS 用 6 種のフタル酸エステル混合標準溶液を 5 回測定したときの面積値を示した。その結果、BBP では検量線の最低濃度である 2.5 ng/mL、DNOP、DINP および DIDP も各検量線の最低濃度である 5 ng/mL における面積値が「平均値+10×SD」の値よりも大きかった。一方 DBP では検量線の最低濃度よりも 1 段階高い 7.5 ng/mL、DEHP では 3 段階高い 25 ng/mL における面積値が「平均値+10×SD」の値よりも大きかった。以上より、各フタル酸エステルの定量下限は、DBP が 7.5 ng/mL、BBP が 2.5 ng/mL、DEHP が 25 ng/mL、DNOP、DINP および DIDP が 5 ng/mL であった (表 7)。また、条件 C および D についても同様の検討を行った結果、いずれも条件 A とほぼ同等の検量線範囲、定量下限および相関係数 ($r>0.997$) が得られた (表 7)。

GC/MS における定量下限は DBP が 10 ng/mL、BBP および DEHP が 20 ng/mL、DNOP が 50 ng/mL、DINP が 200 ng/mL、DIDP が 500 ng/mL であることから²⁾、LC/MS/MS 法の定量下限は GC/MS と比べ同等もしくはそれよりも低かった。特に DINP および DIDP は 40 倍以上感度が高かった。

4) 試験溶液調製法の検討

試料から抽出液を調製するまでの操作は通知試験法¹⁾に従った。しかし、この抽出法ではアセトン・ヘキサンの混液を抽出溶媒として用いるため、そのままでは LC/MS/MS で測

定できない。そこで抽出液を乾固した後、移動相と類似の溶媒に再溶解した。

抽出液を濃縮乾固する際にエバポレーターを用いると揮発したフタル酸エステル類がエバポレーター内に吸着し回収率の低下や、装置汚染の原因となる⁶⁾。そこで抽出液の濃縮乾固は窒素気流下で穏やかに行うこととした。また、再溶解する溶媒は各可塑剤の溶解性を考慮して 0.1%ギ酸メタノールを用いた。

抽出物を濃縮乾固した際の残留物は 0.1%ギ酸メタノールに完全に溶解せず白濁した。PVC 製品の抽出液には塩化ビニルオリゴマーが混在していることから²⁾、白濁の原因は 0.1%ギ酸メタノールに不溶の塩化ビニルオリゴマーによるものと考えられた。そこで LC/MS/MS に注入する前に塩化ビニルオリゴマーを除去するため不溶物をシリンジフィルターでろ過して取り除くことにした。

シリンジフィルターには、HPLC 用に汎用されるポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製 (Millex LG 0.2 μm , Millipore 社製) およびポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製 (Millex GV 0.22 μm , Millipore 社製) の 2 種類を用いた。シリンジもしくはシリンジフィルターがフタル酸エステルで汚染されている可能性や、フタル酸エステルがフィルターに吸着する可能性があるため、フィルターろ過前後での 6 種のフタル酸エステルの定量イオンの面積値を比較した。そこで、定量下限に相当する濃度の標準溶液をシリンジフィルターでろ過し、最初のろ液 1 mL は捨て、その後のろ液を LC/MS/MS で測定した。6 種のフタル酸エステルについて、ろ過前のピーク面積値に対するろ過後のピーク面積値の割合を図 8 に示した。

PVDF 製シリンジフィルターではろ過後に DBP および DEHP のピーク面積値が 15~20% 程度減少し、シリンジフィルターへの吸着が疑われた。一方、PTFE 製シリンジフィルター

表6 6種のフタル酸エステル標準溶液の面積値(LC条件A)

フタル酸エステル 濃度 (ng/mL)	DBP			BBP		DEHP					DNOP		DINP		DIDP	
	0	5	7.5	0	2.5	0	5	7.5	10	25	0	5	0	5	0	5
1	9498	22798	27859	114	4965	159263	187841	187299	204149	258484	458	22468	3631	10772	623	4157
2	9910	31090	40122	131	5010	171226	194483	197185	210827	263137	34	26372	3527	11473	554	4819
3	12890	26452	38662	119	5324	170889	193840	204207	215582	270322	54	27747	4088	11536	470	4699
4	9011	34770	42500	74	5368	171004	188559	193944	208273	267637	117	29360	4401	11613	610	4880
5	12698	26753	31470	70	5481	181693	180004	185287	205477	253457	533	29340	3580	12048	853	4738
平均値 (AVE)	10801	28373	36123	102	5230	170815	188945	193584	208862	262607	239	27057	3845	11488	622	4659
標準偏差 (SD)	1848			28		7937					237		383		143	
AVE+10×SD	29280			379		250186					2614		7671		2047	

表7 各LC条件における6種のフタル酸エステルの検量線範囲、定量下限および相関係数

フタル酸 エステル	条件A			条件C			条件D		
	検量線範囲 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	相関係数 (<i>r</i>)	検量線範囲 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	相関係数 (<i>r</i>)	検量線範囲 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	相関係数 (<i>r</i>)
DBP	7.5-75	7.5	0.9996	7.5-100	7.5	0.9991	5-50	5	0.9996
BBP	2.5-50	2.5	0.9998	2.5-50	2.5	0.9974	2.5-50	2.5	0.9997
DEHP	25-100	25	0.9992	25-100*	25*	0.9997*	-	-	-
DNOP	5-50	5	0.9991	10-100*	10*	0.9996*	-	-	-
DINP	5-100	5	0.9999	5-100	5	0.9996	-	-	-
DIDP	5-75	5	0.9997	5-100	5	0.9994	-	-	-

*個別に測定, -: 分離できないため計算しなかった

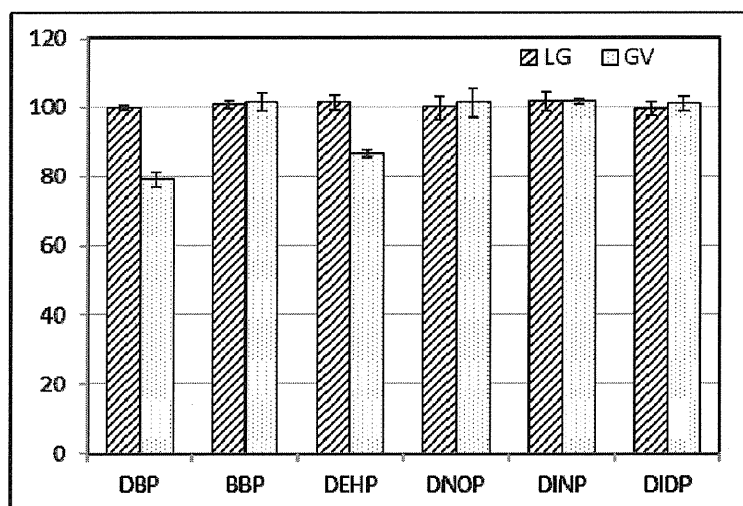


図8 フィルターろ過の影響

数値はフィルターろ過後のピーク面積値に対するフィルターろ過前のピーク面積値の割合(%) (n=5)
 LG: Millex LG 0.2 μm, GV: Millex 0.22 μm (いずれも Millipore 社製)

ではろ過前後のフタル酸エステルのピーク面積値に違いはみられなかった。以上より、PTFE 製シリンジフィルターを用いることとした。

5) LC/MS/MS 法の評価

本研究で検討した LC/MS/MS 法を評価するため、試料 1~3 の抽出液に規格値相当の 6 種のフタル酸エステルを添加した溶液を用いて、本法にしたがい 1 日 2 併行で日を変えて 5 回試験を行った。6 種のフタル酸エステルの定量値と解析結果を表 8 に示した。

試料 1 は DEHA、DINA、ATBC および TMPD を含有するため、DNOP および DIDP は条件 A、DEHP は条件 B、DBP および DINP は条件 C、BBP は条件 D を用いて定量した。またその他の添加剤の含有を確認するためスキャンモードであらかじめ測定した。その結果、酸化防止剤の 3,3'-チオジプロピオン酸ジテトラデシル (DMTDP, CAS No.16545-54-3) と推測されるピークが条件 C で DINP のピークと重なった (図 9)。そこでこれらを分離するため、Cosmosil 2.5πNAP カラムを用い、グラジエント条件を B 液 80%→直線グラジエント (25 min) →85%、流速を 0.3 mL/min とし

て、DINP と DMTDP は完全に分離することができたが、DINA がわずかに重なった (図 10)。しかし、2. 2) (4) と同様に DINA 共存時の DINP の定量イオンへの影響を確認したが影響はみられなかった。したがって本条件を LC 条件 E とし、DINP の定量を行った。その結果、真度は 91.0~99.4%、併行精度は 2.7~6.2%、室内再現精度は 2.7~8.2%と良好で日間変動も小さかった。

試料 2 は ATBC、DINA、TMPD および TBC を含有するため、DEHP、DNOP および DIDP は条件 A、DBP および DINP は条件 C、BBP は条件 D で定量した。その他の添加剤の含有を確認するためスキャンモードであらかじめ測定したが、測定に影響する化合物のピークはみられなかった。真度は 88.2~96.9%、併行精度は 2.0~9.1%、室内再現精度は 2.1~10.6%とほぼ良好な結果が得られた。

試料 3 は DINCH、DEHP および TMPD を含有するため、DEHP、DNOP および DINP は条件 A、DBP、BBP および DIDP は条件 C で定量した。その他の添加剤の含有は確認されなかった。真度は 94.3~99.1%、併行精度は 2.1~5.6%、室内再現精度は 3.8~6.0%と良好で

表8 LC/MS/MSによる定量値とその評価

測定日	DBP		BBP		DEHP		DNOP		DINP		DIDP	
試料 1												
LC 条件	C		D		B		A		E		A	
1	0.111	0.101	0.092	0.098	0.100	0.100	0.091	0.097	0.091	0.098	0.091	0.094
2	0.091	0.113	0.091	0.095	0.097	0.096	0.098	0.096	0.091	0.089	0.095	0.096
3	0.106	0.102	0.094	0.091	0.100	0.103	0.102	0.104	0.093	0.093	0.100	0.098
4	0.092	0.095	0.096	0.095	0.096	0.103	0.102	0.098	0.091	0.095	0.085	0.087
5	0.095	0.088	0.091	0.091	0.097	0.102	0.094	0.090	0.096	0.093	0.085	0.078
平均值 (%)	0.095		0.094		0.099		0.097		0.093		0.091	
真度 (%)	95.4		93.5		99.4		97.2		93.0		91.0	
RSD _r	6.2		2.7		2.9		2.9		3.1		2.8	
RSD _R	6.7		2.7		2.9		5.0		3.1		8.2	
試料 2												
LC 条件	C		D		A		A		C		A	
1	0.084	0.077	0.093	0.097	0.102	0.100	0.094	0.096	0.088	0.090	0.093	0.097
2	0.100	0.092	0.092	0.094	0.091	0.093	0.098	0.098	0.090	0.090	0.091	0.092
3	0.103	0.096	0.095	0.098	0.096	0.095	0.093	0.098	0.089	0.087	0.083	0.087
4	0.102	0.090	0.096	0.098	0.105	0.097	0.090	0.092	0.084	0.086	0.095	0.098
5	0.086	0.109	0.096	0.099	0.094	0.096	0.095	0.095	0.086	0.091	0.094	0.096
平均值 (%)	0.094		0.096		0.097		0.095		0.088		0.092	
真度 (%)	93.8		95.8		96.9		94.9		88.2		92.5	
RSD _r	9.7		2.0		2.8		2.0		2.1		2.3	
RSD _R	10.6		2.1		4.5		3.0		2.7		5.4	
試料 3												
LC 条件	C		C		A		A		A		C	
1	0.088	0.097	0.093	0.087	0.097	0.097	0.098	0.092	0.100	0.084	0.090	0.085
2	0.089	0.087	0.095	0.101	0.100	0.095	0.098	0.101	0.100	0.100	0.095	0.100
3	0.101	0.101	0.098	0.105	0.094	0.097	0.098	0.103	0.099	0.099	0.097	0.097
4	0.099	0.095	0.094	0.098	0.104	0.102	0.093	0.093	0.089	0.096	0.092	0.095
5	0.091	0.096	0.098	0.093	0.102	0.103	0.094	0.091	0.099	0.099	0.100	0.094
平均值 (%)	0.094		0.096		0.099		0.096		0.096		0.094	
真度 (%)	94.3		96.2		99.1		95.9		96.5		94.4	
RSD _r	3.9		4.0		2.1		2.8		5.6		3.1	
RSD _R	6.0		5.2		3.8		4.4		5.7		5.1	

RSD_r: 併行精度, RSD_R: 室内再現精度

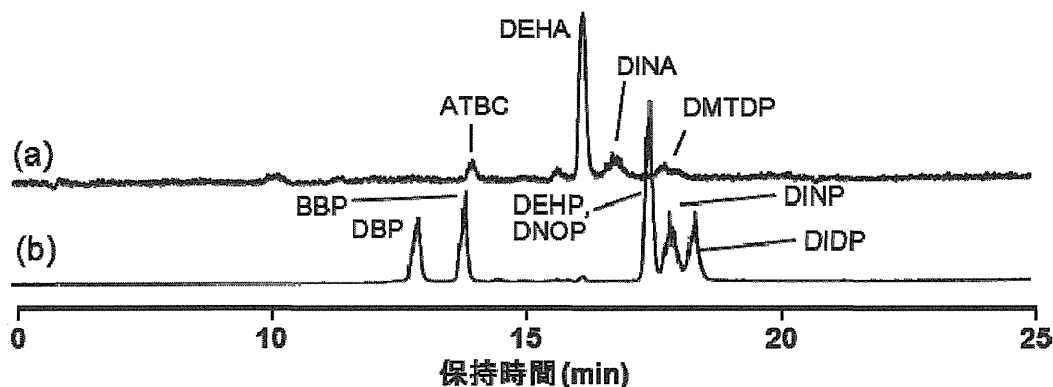


図9 LC 条件 C による (a) 試料 1 から得られた抽出液のトータルイオンクロマトグラム(スキャン)および (b) 6 種のフタル酸エステル混合標準溶液 (0.5 µg/mL) の MRM クロマトグラム

(a) のスキャン範囲は m/z 20-600、(b) MRM 条件は表3を用いた。

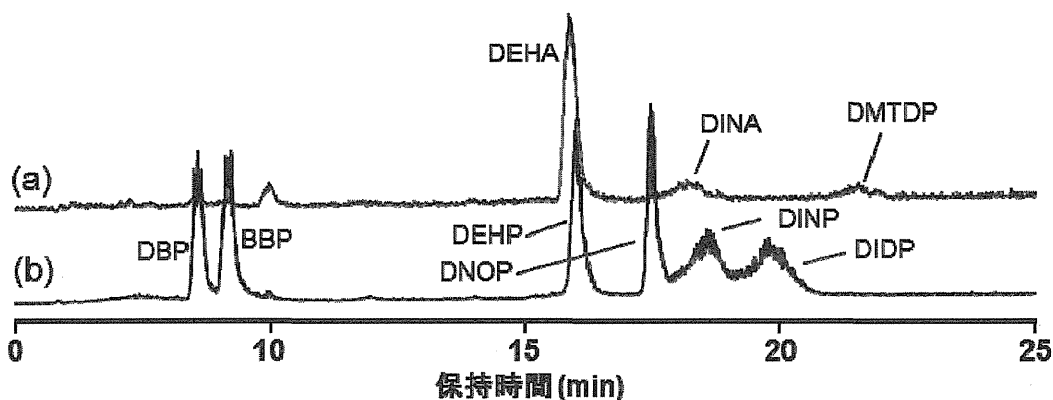


図10 LC 条件 E による (a) 試料 1 から得られた抽出液のトータルイオンクロマトグラム(スキャン)および (b) 6 種のフタル酸エステル混合標準溶液 (0.5 µg/mL) の MRM クロマトグラム

(a) のスキャン範囲は m/z 20-600、(b) MRM 条件は表3を用いた。

あった。

以上のように共存する可塑剤や添加剤と分離する LC 条件を用いることにより 6 種のフタル酸エステルを精度良く定量できることが示された。

D. 結論

食品衛生法で規定されているフタル酸エステル試験法である GC/MS 法について、6 種のフタル酸エステル以外の汎用可塑剤による影響の有無を検証した。その結果、DNOP および DINP と保持時間が重なる DINA および DEHP が大量に含まれていた場合に定量値が 110%を超えることがあり、正確な定量が困難な場合があることが明らかとなった。

そこで GC/MS に替わる新たな 6 種のフタル酸エステル測定法として LC/MS/MS を用いた測定法を開発した。本法は、公定法と同様の抽出液を用いるが、その後の操作で塩化ビニルオリゴマーを除去し LC/MS/MS 分析を可能とした。また、製品に汎用される共存可塑剤による影響を避けるため、複数のカラムおよび適切な条件を選択して測定する必要があるが、6 種のフタル酸エステルを精度よく測定できることが示された。そのため、本法は GC/MS により 6 種のフタル酸エステルと分離が困難な可塑剤が検出された場合に 6 種のフタル酸エステルが含有されているかどうかの確認法として有用なだけでなく、ヘリウム不足により GC/MS による測定が困難な場合の定量法

としても利用できる。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
‘おもちゃにおけるフタル酸エステルの試験法について’平成22年9月6日食安発0906第4号
- 2) 阿部 裕, 六鹿元雄, 平原嘉親, 河村葉子 :
ポリ塩化ビニル製品中の6種のフタル酸エステル試験法, 食品衛生学雑誌, 52, 309-313 (2011)
- 3) Sandra Biedermann-Brem, Maurus Biedermann, Susanne Pfenninger, Martina Bauer, Werner Altkofer, Karl Rieger, Urs Hauri, Christian Droz, Koni Grob: Plasticizers in PVC Toys and Childcare Products: What Succeeds the Phthalates? Market Survey 2007, Chromatographia, 68, 227-234 (2008)
- 4) 阿部 裕, 山口未来, 六鹿元雄, 平原嘉親, 河村葉子 : ポリ塩化ビニル製玩具中の可塑剤使用実態, 食品衛生学雑誌, 53, 19-27 (2012)
- 5) Qian Xu, Xueyan Yin, Min Wang, Haifeng Wang, Niping Zhang, Yanyan Shen, Shi Xu, Ling Zhang, Zhongze Gu: Analysis of phthalate migration from plastic containers to packaged cooking oil and mineral water, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 11311-11317 (2010)
- 6) Xiaojing Li, Wenming Xiong, Hua Lin, Liyang Zhuo, Shuiyuan Lv, Xi Tang, Minshi Chen, Zhexiang Zou, Zhenyu Lin, Bin Qiu, Guonan Chen: Analysis of 16 phthalic acid esters in food simulants from plastic food contact materials by LC-ESI-MS/MS, Journal of Separation Science, 36, 477-484 (2013)
- 7) 杉田たき子, 平山クニ, 新野竜太, 石橋 亨, 山田 隆: ポリ塩化ビニル製玩具中のフタル酸エステル含有量, 食品衛生学雑誌, 42, 48-55 (2001)
- 8) 河村葉子, 六鹿元雄, 和久井千世子, 棚元憲一: ポリ塩化ビニル中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)及びフタル酸ジイソノニル試験法, 日本食品化学学会誌, 9, 101-106 (2002)

＜その2＞ 植物油総溶出量試験法の改良 試料の恒量化及び植物油定量法に関する検討

研究協力者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 中西 徹、川口 寿之 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

オリブ油総溶出量試験(Overall Migration Test into Olive Oil)は、欧州連合の総溶出量試験(Overall Migration Test、我が国の蒸発残留物試験に相当)において、油脂及び脂肪性食品用食品接触物質の試験として採用されている。また、その試験法等は欧州規格 EN 1186¹⁾(EN規格)に記載されている。

オリブ油などの植物油は、油脂及び脂肪性食品の一つで溶出力が高いことから、油脂及び脂肪性食品の擬似溶媒として、特定物質の移行量試験などに汎用されている。しかし、蒸発乾固が困難であることから、蒸発残留物量を測定する総移行量試験に使用することはできない。そこで、その代替としてオリブ油総溶出量試験が考案された。

オリブ油総溶出量試験では、まず試料の水分や揮発性成分量が一定になるように安定化させて質量を測定し、溶出前の試料質量(W_a , mg)とする。次に、オリブ油と所定の条件で接触させ、試料中の含有物質を溶出させる。試料に付着したオリブ油をろ紙等で十分に拭き取り、再度安定化させて質量を測定し、溶出後の試料質量(W_b , mg)とする。その後、試料中に残存するオリブ油を溶媒で抽出し、メチルエステル化してガスクロマトグラフィーで測定し、残存していたオリブ油量(W_c , mg)を求める。溶出前の試料質量と、溶出後の試料質量から残存オリブ油量を差し引いたものとの差

を、試料から溶出した物質の総量、すなわちオリブ油総溶出量(M mg/cm²)とする。

$$M = \frac{W_a - (W_b - W_c)}{S}$$

このようにオリブ油総溶出量試験法は操作が極めて煩雑で、しかも各工程において試験誤差を生じる要因が多い。そのため、試験には熟練した技術が求められ、実施できる試験機関は限られている。

平成 19～21 年度厚生労働科学研究「食品用器具・容器包装、乳幼児用玩具及び洗浄剤の安全性確保に関する研究」及び平成 22～24 年度厚生労働科学研究「食品用器具・容器包装及び乳幼児用玩具の安全性向上に関する研究」において、合成樹脂及びゴム製器具・容器包装の蒸発残留物試験について検討を行った。その中で、油脂及び脂肪性食品の溶出試験条件を設定するため、オリブ油総溶出量試験を実施してオリブ油総溶出量を求め、それをもとに代替溶媒の試験条件を設定した。今後も、合成樹脂やゴムに対する新たな代替条件を設定し、また油脂及び脂肪性食品への移行傾向を明らかにするために、オリブ油総溶出量試験が必要である。

本試験は、主にオリブ油を用いて溶出試験を行うことからオリブ油総溶出量試験と呼ばれてきた。しかし、最近、欧州連合は油性食品の擬似溶媒をオリブ油から植物油に拡大し、

オリブ油以外の植物油を用いることを認めた。平成 20 年度厚生労働科学研究²⁾においても、オリブ油、ナタネ油、合成トリグリセライドによる溶出量は同程度であり、液状の植物油や合成トリグリセライドであればいずれでも使用可能であることを確認した。また、合成樹脂中の添加剤とオリブ油のピークがガスクロマトグラム上で一致しオリブ油量が測定できない場合には、ベニバナ油などで代替して総溶出量を求める必要がある。そこで、本研究では試験法の名称をオリブ油総溶出量試験法から植物油総溶出量試験法に改め、オリブ油以外の植物油も使用できることを明確にすることとした。

本研究では EN 規格のオリブ油総溶出量試験法を改良し、より精度が高くしかも簡便な植物油総溶出量試験法の開発を行うこととした。これにより、多くの試験機関で実施可能で、公定法としても採用可能な試験法の確立を目指す。今年度は本試験法のうち試料の恒量化及び植物油の定量法について検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

市販のポリエチレンシート (厚さ 0.1 mm)、ポリプロピレンフィルム (厚さ 0.03 mm)、ポリ塩化ビニルフィルム (厚さ 0.009 mm)、シリコーンゴムシート (厚さ 0.5 mm)、天然ゴムシート (厚さ 0.5 mm)、ナイロンシート (厚さ 0.3 mm) の 6 試料を用いた。

2. 試薬及び試液

95%硫酸、水酸化カリウム、硫酸ナトリウム：試薬特級、小宗化学薬品(株)製

シリカゲル：乾燥用、関東化学(株)製

オリブ油：和光純薬工業(株)製

ヘプタン、酢酸：特級、関東化学(株)製

ナトリウムメトキシド溶液：28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液、和光純薬工業(株)製

メタノール：残留農薬試験・PCB 試験用(5000 倍濃縮)、関東化学(株)製

三フッ化ホウ素メタノール溶液：14%三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液、和光純薬工業(株)製

硫酸：水 543 g に 95%硫酸 457 g を少量ずつ混和した。

100 mg/ml オリブ油溶液：オリブ油 5.00 g を量り、ヘプタンで 50 ml に定容した。

0.5 mol/L 水酸化カリウムメタノール溶液：水酸化カリウム 2.8 g を少量の水に溶解し、メタノールで 100 ml に定容した。

飽和硫酸ナトリウム溶液：硫酸ナトリウム 200 g に水 800 ml を加え、約 70°C で加温溶解後冷却した。

3. 装置

電子天秤：XS204 及び AG245 (いずれも最小表示 0.1 mg)、以上メトラー・トレド(株)製

真空定温乾燥器：DP43、ヤマト科学(株)製

恒温恒湿器：THN052FA、(株)東洋製作所製

恒温振とう水槽：T-N22S、トーマス科学器械(株)製

振とう機：エルビス・シェーカー、(株)杉山元医理器製

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(GC-FID)：6890N、Agilent Technologies 社製

4. 試料の恒量化の検討

1) 質量の測定

6 種類の試料を各 4 試行で試験した。試料は 10 cm×10 cm に切断して質量を測定後、下記の 4 種類の安定化条件に静置した。約 24 間後に試料を取り出し質量を測定した。この

操作を9回繰り返したが、5回目は4回目から約72時間後とした。それぞれ連続する2回の質量差を求めた。

2) 安定化条件

① 硫酸デシケーター法

43.4%硫酸を入れたデシケーターに試料を入れ、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ で静置した(相対湿度 $50\pm 2\%$)。

② 真空定温乾燥器法

真空定温乾燥器の温度を $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ に設定して試料を入れ、1.3 kPa以下まで減圧した。試料は所定の時間静置した後、シリカゲルデシケーターに移し、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ で1時間放冷した。

③ シリカゲルデシケーター法

シリカゲルを入れたデシケーターに試料を入れ、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ で静置した(相対湿度 $10\pm 2\%$)。

④ 恒温恒湿器法

温度を $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度を $50\pm 2\%$ に設定した恒温恒湿器に試料を入れて静置した。

5. 植物油定量法の検討

1) GC-FID 測定条件

① 条件1

カラム：InertCap WAX (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm 、ジーエルサイエンス(株)製)、カラム温度： 50°C (2 min 保持) $\rightarrow 15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow 250^{\circ}\text{C}$ (5 min 保持)、注入方法：スプリット(50 : 1)、注入量：1 μl 、注入口温度： 250°C 、キャリアガス流量：ヘリウム 2.3 ml/min、検出器温度： 250°C 、検出器：FID

② 条件2

カラム：DB-WAX (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.5 μm 、Agilent Technologies 社製)、カラム温度： 100°C (2 min 保持) $\rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow 250^{\circ}\text{C}$ (5 min 保持)、注入方法：スプリット(50 : 1)、注入量：1 μl 、注入口温度： 250°C 、キャリアガス流量：ヘリウム 2.0 ml/min、検出器温度： 250°C 、検出器：FID

2) メチルエステル化法の検討

① ナトリウムメトキシド法

100 mg/ml オリーブ油溶液 5 ml を 100 ml 容量形フラスコに採り、窒素気流下で溶媒を除去した。得られた残留物(オリーブ油 500 mg 相当)にヘプタン 10 ml を加えて溶解し、メタノール 2 ml 及びナトリウムメトキシド溶液 0.5 ml を加えた。室温で 15 分間、振とう器(100 rpm)で振とうした。これに水 5 ml 及び酢酸 0.5 ml を加えて 5 分間振とう後、ヘプタン層を GC-FID (条件 1) で測定した。メチルエステル体生成率(%)は、得られたオリーブ油メチルエステル体の最大ピーク(オレイン酸メチル)の面積と三フッ化ホウ素メタノール法で得られた同一ピークの面積との百分率で表記した。

試験条件の検討において、上記のうちナトリウムメトキシド溶液量、メタノール量、反応温度、反応時間、振とう法、水及び酢酸量を変化させ生成率を比較検討した。

② 三フッ化ホウ素メタノール法

EN 規格に準じた。残留物(オリーブ油 500 mg 相当)に 0.5 mol/L 水酸化カリウムメタノール溶液 4 ml を加え、冷却管を取り付けて 10 分間還流した。三フッ化ホウ素メタノール溶液 5 ml を冷却管の上部から加え 2 分間還流した。さらに、ヘプタン 10 ml を同様に加え 1 分間還流した。冷後、飽和硫酸ナトリウム溶液 30 ml を加えて 5 分間振とうし、ヘプタン層を GC-FID (条件 1) で測定した。

③ ナトリウムメトキシド法の検量線の作成

オリーブ油 0.5~1500 mg を①ナトリウムメトキシド法の残留物と同様に操作し、GC-FID (条件 2) で測定した。オリーブ油メチルエステル体の主ピークであるオレイン酸メチルのピーク面積を用いて検量線を作成した。

C. 研究結果及び考察

1. 試料の恒量化の検討

1) 試料の質量測定

植物油総溶出量試験法では、植物油を用いた溶出操作の前後において試料の質量を測定し、その質量の差を溶出後の試料中に残存する植物油量で補正して植物油総溶出量を求める。そのため、溶出前後の試料の質量を精度よく測定することが、分析精度の向上に不可欠である。

しかし、合成樹脂やゴムは材質によって吸水性の高いもの、揮発性成分を多く含有するものなどがある。そのため、試料保存時の温度や湿度、密封の有無、試料どうしの密着の度合いなどにより質量が変動することがある。

そのため、試料の質量測定に際しては、水分や揮発性成分量が一定の状態になるように試料を安定化させながら、繰り返し質量測定を行い、そのばらつきが十分に小さくなった質量を得る必要がある。このような質量の変動が十分に小さくなった状態またはその質量を恒量という。溶出操作終了後に再度質量を測定する際にも、含有する植物油を除けば試料が同じ状態になるように、同一の環境下で安定化して質量を求める。

EN規格では、試料の安定化条件として、相対湿度 80 または 50% の環境下で静置し、水分含量が高くいずれでも安定化しない場合には $60 \pm 5^\circ\text{C}$ 、1.3 kPa 以下の減圧下で静置することとしている。また、恒量については、安定化しながら約 24 時間以上の間隔で質量測定を行い、連続する 2 回の質量差が 2 mg/dm^2 の範囲内に収まった質量としている。

そこで本研究では、汎用樹脂であるポリエチレン及びポリプロピレン、揮発性成分を多く含有するポリ塩化ビニル、水分を含有しやすいシリコーンゴム、天然ゴム及びナイロンの 6 種類の材質について、恒量測定のための最

適な試料の安定化条件を検索するとともに、本試験法に適した恒量の定義についても検討した。

2) 試料の安定化条件

試料の安定化条件として、EN 規格で定める硫酸デシケーター ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 2\%$) 及び真空定温乾燥器 ($60 \pm 5^\circ\text{C}$ 、1.3 kPa 以下) のほかに、一般に試料の安定化に汎用されるシリカゲルデシケーター ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $10 \pm 2\%$) 及び前述の硫酸デシケーターと同じ温度及び相対湿度に設定した恒温恒湿器 ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 2\%$) の 4 条件を検討した。

① 硫酸デシケーター法

硫酸デシケーターについて、EN 規格では相対湿度 50% を与える硫酸濃度として 43%w/v と記載されている。しかし、この条件で調整すると相対湿度は約 70% となり、相対湿度 50% は得られなかった。一方、JIS Z 0701³⁾ には、相対湿度 50% を与える硫酸濃度として 43.4 質量% と記載されている。そこで、JIS に準じて質量比が 43.4% となる硫酸を用いて硫酸デシケーターを調整したところ、相対湿度は 50% となった。そこで、本研究では 43.4% 硫酸を用いて硫酸デシケーターを調整することとした。

硫酸デシケーター (20°C 、相対湿度 50%) 法における試料の初期質量と質量差を表 1 に示した。

ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルでは 1 回目から 9 回目まですべての質量差が 0.5 mg 以下と極めて安定であった。また、天然ゴムでも 4 回目に 2 検体で 0.8 mg の減少が見られたが、それ以外はすべて 0.5 mg 以下と安定であった。一方、シリコーンゴムでは 1~2 回目に 2 mg 程度の増加が見られ、デシケーター内の水分を吸収したためと推測された。しかし、3 回目以降はほぼ 1 mg 以下、

7回目以降は0.5 mg以下と安定した。また、ナイロンでは1回目に2.8~3.8 mgの質量減少が見られた。ナイロンは水分含量が高い樹脂であることから、水分を放出したための減少と推測された。その後は次第に安定化し、3回目以降は質量差1 mg以下、6回目以降は0.5 mg以下となった。

② 真空定温乾燥器法

真空定温乾燥器（60℃、1.3 kPa以下）法における試料の初期質量と質量差を表2に示した。ポリエチレンは1回目に1.1~1.6 mg

の質量増加が見られたが、その後は1 mg以下、3回目以降はほぼ0.5 mg以下と安定した。ポリプロピレンも1~2回目に若干の変動が見られたが、3回目以降はすべて0.5 mg以下と安定であった。一方、ポリ塩化ビニル、シリコーンゴム、天然ゴム、ナイロンは、当初の質量減少のあとも安定せず、9回目まで0.5 mgを超えるものが散見され安定した状態にはならなかった。これは、減圧により試料中の水分や揮発性成分が放出され続けたためと推測された。

表1 硫酸デシケーター（20℃、相対湿度50%）における質量変化

試料の材質	初期質量 (mg)	質量差 (mg)								
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目
ポリエチレン	592.1	0.0	-0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.1	0.1
	606.8	0.1	-0.4	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	-0.2
	589.7	-0.3	-0.2	0.1	-0.2	0.0	-0.2	0.3	0.0	-0.2
	573.7	-0.3	-0.1	0.0	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.2	-0.1
ポリプロピレン	261.0	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.2	-0.1	0.0	0.0	-0.1
	261.6	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.3	-0.2	0.1	0.2
	260.3	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.1	-0.1	-0.3
	257.1	-0.1	0.0	0.1	-0.2	0.0	0.2	0.0	-0.1	0.2
ポリ塩化ビニル	110.4	-0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.3	0.0
	121.7	-0.1	-0.1	0.1	0.0	0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.1
	117.6	0.0	-0.3	0.1	-0.1	0.4	-0.2	0.1	-0.1	0.0
	120.5	0.1	-0.2	0.1	-0.2	0.2	0.0	0.0	-0.1	0.1
シリコーンゴム	5665.4	2.1	1.0	0.0	0.0	0.1	-0.2	0.4	0.5	-0.3
	5578.4	1.9	0.5	-0.1	0.2	-0.2	-0.4	0.5	0.5	-0.3
	5449.5	1.9	0.8	0.7	0.6	-0.6	-1.2	0.5	0.5	-0.3
	5651.9	2.0	2.3	-1.3	-0.4	0.1	0.1	-0.5	0.0	0.3
天然ゴム	7083.3	-0.5	0.4	0.4	-0.8	-0.4	-0.3	-0.2	-0.5	0.0
	6863.0	-0.2	0.4	0.1	-0.8	-0.3	-0.4	-0.1	0.4	-0.2
	6926.1	-0.2	0.3	0.1	-0.5	-0.5	-0.2	-0.4	0.2	0.0
	6990.3	-0.3	0.0	0.1	-0.5	-0.5	-0.1	-0.1	-0.4	0.3
ナイロン	3263.6	-3.8	-1.4	-0.4	-0.1	-0.6	-0.3	-0.1	0.3	0.5
	3323.8	-2.9	-1.6	-0.3	-0.3	-0.7	0.3	0.0	0.5	0.5
	3346.3	-2.8	-0.8	-0.9	-0.2	-0.5	0.1	-0.1	0.3	0.1
	3659.0	-3.4	-0.8	-0.9	-0.5	-0.4	-0.1	0.4	0.4	0.4

表2 真空定温乾燥器 (60°C、1.3 kPa 以下) における質量変化

試料の材質	初期質量 (mg)	質量差 (mg)								
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目
ポリエチレン	582.0	1.1	0.7	0.4	0.1	0.0	0.3	-0.1	-0.1	-0.3
	576.3	1.2	0.4	0.5	0.0	0.8	0.0	0.0	-0.4	-0.2
	623.1	1.3	0.6	0.0	0.4	0.3	0.0	-0.2	-0.2	-0.1
	629.0	1.6	-0.1	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	-0.2	-0.2
ポリプロピレン	260.2	0.2	0.6	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.0
	261.6	0.0	0.9	0.0	0.1	0.4	0.1	0.0	0.0	0.3
	258.0	0.7	0.3	0.4	0.1	0.0	0.3	0.1	-0.1	0.0
	263.6	0.8	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0
ポリ塩化ビニル	116.3	-1.0	-1.3	-2.3	-0.5	-2.0	-1.2	-0.3	-1.0	-0.4
	120.3	-1.4	-1.8	-1.6	-0.5	-1.5	-0.4	-0.5	-0.7	-0.3
	110.7	-1.4	-1.4	-1.1	-0.7	-1.6	-0.8	-0.5	-0.8	-0.6
	112.1	-2.5	-2.3	-1.7	-0.4	-1.4	-0.8	-0.4	-0.7	-0.3
シリコーンゴム	5686.0	-15.9	-6.2	0.3	0.5	-3.4	1.2	-0.3	0.4	-4.2
	5466.0	-21.0	-4.7	6.7	0.4	-4.7	-2.2	2.0	4.5	-6.5
	5569.3	-21.1	-5.9	10.5	1.8	-9.5	-1.4	2.7	0.6	-2.1
	5547.7	-21.5	-4.2	6.0	3.1	-11.5	-0.7	4.6	-0.8	-4.1
天然ゴム	6971.7	-32.3	-21.3	-17.9	-11.5	-18.9	-6.6	-5.7	-0.4	-9.3
	7032.4	-40.0	-25.9	-9.9	-8.3	-15.7	-5.9	-5.5	0.0	-8.2
	7047.3	-42.5	-29.4	-7.5	-7.1	-13.6	-5.7	-5.0	0.0	-7.6
	7151.8	-46.1	-32.4	-6.5	-8.4	-14.1	-5.8	-5.5	0.7	-7.8
ナイロン	3674.5	-126.5	-9.1	-0.6	2.1	0.4	-2.6	1.1	-0.2	-0.8
	3606.9	-125.3	-8.4	0.6	2.0	0.1	-2.3	1.1	-0.3	-0.9
	3659.3	-127.8	-7.6	0.8	2.0	0.1	-2.4	1.0	-0.5	-0.6
	3683.1	-129.0	-7.3	0.6	1.7	0.0	-2.0	1.1	-0.5	-0.3

③ シリカゲルデシケータ法

シリカゲルデシケータ (20°C、相対湿度 11%) 法における試料の初期質量と質量差を表3に示した。

ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルは、硫酸デシケータよりやや変動が大きいものの1回目から9回目まですべての質量差が0.5 mg以下であった。一方、天然ゴムは1回目では5 mg程度の質量減少が見られたが、4回目以降は0.5 mg以下と

安定であった。また、ナイロンは1回目で62.2~63.6 mgと大幅な質量減少が見られたが次第に減少幅が縮まり、8回目以降は0.5 mg以下となった。試料中の水分や揮発性成分が次第に放出され、デシケータ内の環境とほぼ平衡に達したものと推測された。シリコーンゴムは1回目に6.3~11.5 mgと大幅な質量減少が見られたが、その後増減を繰り返し、9回目でも質量差は-2.7~0.9 mgと安定しなかった。シリコーンゴ

表3 シリカゲルデシケーター (20℃、相対湿度 11%) における質量変化

試料の材質	初期質量 (mg)	質量差 (mg)								
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目
ポリエチレン	567.0	-0.3	0.0	-0.2	0.2	0.5	-0.4	0.0	-0.3	0.4
	574.5	0.0	-0.2	0.1	-0.2	0.4	-0.3	-0.3	0.0	0.1
	557.6	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.5	-0.4	0.0	0.1	-0.1
	580.8	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	-0.1	0.2
ポリプロピレン	263.1	-0.3	0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.0	0.1	-0.1	0.0
	262.5	-0.2	0.3	-0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1
	261.1	-0.1	-0.1	0.0	0.1	0.0	-0.3	0.4	-0.1	0.1
	261.9	0.1	-0.1	0.2	-0.1	0.4	-0.3	0.0	0.0	-0.2
ポリ塩化ビニル	119.6	-0.2	0.0	0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.1
	123.4	-0.1	0.1	-0.1	0.1	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.0
	117.2	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.0
	115.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	-0.2	-0.2	0.0	0.1
シリコーンゴム	5654.3	-10.9	-0.4	-0.1	-0.2	5.5	-4.6	1.1	0.2	0.9
	5602.0	-11.4	-0.6	3.2	-4.2	3.6	-0.9	0.0	1.8	-1.4
	5567.1	-6.3	-5.5	0.5	-0.4	2.7	-1.9	0.2	3.7	-2.7
	5657.3	-11.5	-0.4	0.9	-0.4	2.6	-1.7	-0.3	3.0	-1.8
天然ゴム	7340.9	-5.5	-0.4	-0.6	-0.3	-0.2	-0.5	-0.1	0.2	-0.5
	7272.1	-5.2	-0.5	-0.4	-0.2	-0.3	-0.5	-0.5	0.1	-0.1
	7169.1	-4.9	-0.7	-0.1	-0.1	-0.2	-0.5	-0.5	0.4	-0.3
	7232.1	-4.7	-0.9	0.2	0.1	-0.5	-0.5	-0.4	0.4	-0.5
ナイロン	3630.8	-62.4	-25.7	-15.1	-8.1	-9.2	-1.8	-1.1	0.5	-0.3
	3503.6	-62.2	-25.0	-14.7	-7.1	-7.2	-1.9	-0.3	0.1	-0.1
	3417.8	-63.6	-25.0	-13.0	-6.8	-6.3	-1.6	-0.5	0.2	0.0
	3448.5	-63.2	-25.2	-13.2	-6.9	-6.7	-1.8	0.0	0.4	-0.4

ムは乾燥すると帯電しやすいため、天秤による秤量値が安定しなかったことが一因と推測された。

④ 恒温恒湿器法

恒温恒湿器 (温度 20℃、相対湿度 50%) 法における試料の初期質量と質量差を表4に示した。ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルでは、硫酸デシケーターよりばらつきが見られるものの、1回目から9回目までの質量差はほぼ 0.5 mg 以下であった。一方、天然ゴムは9回目まで質量の減少が続き

安定しなかった。シリコーンゴム及びナイロンでは 1~2 回目の質量減少が落ち着いた後も増加と減少の変動が見られ、8または9回目でも 1 mg 以上の変動が見られた。

恒温恒湿器による安定化は硫酸デシケーターと同一の温度及び相対湿度であることから同様の安定化が期待されたが、かなり異なる結果となった。恒温恒湿器では空気の循環を目的としてファンが取り付けられており、ファンにより発生した風が試料に直接あたるため質量が安定しなかったと推測された。

表4 恒温恒湿器 (20℃、相対湿度 50%) における質量変化

試料の材質	初期質量 (mg)	質量差 (mg)								
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目
ポリエチレン	602.8	0.5	0.1	-0.2	0.0	0.6	-0.2	0.0	0.1	-0.2
	599.2	0.1	0.1	-0.2	0.3	0.4	-0.3	-0.3	0.4	-0.4
	584.5	0.2	-0.1	0.1	0.1	0.5	-0.4	-0.2	0.0	-0.2
	588.4	0.4	0.2	0.0	0.0	0.2	-0.3	0.0	0.0	0.1
ポリプロピレン	259.1	-0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	-0.3	0.0	0.1	0.1
	261.5	0.2	-0.3	0.2	-0.1	0.3	-0.3	0.5	-0.2	0.0
	256.9	0.1	-0.2	0.0	0.2	-0.4	0.0	0.3	-0.1	0.0
	263.8	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	-0.4	-0.2	0.2	0.2
ポリ塩化ビニル	112.9	0.2	-0.4	0.3	0.1	-0.5	0.3	-0.1	-0.3	0.2
	129.8	-0.2	0.3	-0.1	0.2	-0.2	-0.2	0.1	0.0	-0.3
	119.7	0.1	0.1	-0.1	0.1	-0.2	-0.2	0.2	-0.2	0.1
	120.9	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-0.2	0.2	-0.2
シリコーンゴム	5640.9	-1.4	0.1	1.4	1.0	-2.4	2.0	-0.1	-1.5	-0.8
	5681.7	-3.4	0.5	0.8	1.6	-3.1	2.0	-0.1	-1.9	-0.9
	5715.2	-4.5	0.3	0.7	1.3	-2.2	2.0	0.0	-2.1	-0.6
	5697.1	-3.3	0.5	1.2	1.3	-3.4	2.4	0.0	-1.9	-0.6
天然ゴム	7287.8	-3.1	-1.2	-1.4	-0.5	-4.5	-1.1	-0.9	-1.2	-1.1
	7313.4	-4.9	-1.9	-2.3	-0.5	-4.9	-1.2	-0.6	-2.6	-1.2
	7312.9	-4.4	-2.1	-2.2	-1.1	-4.7	-0.2	-1.4	-1.6	-1.2
	7326.8	-4.7	-1.5	-2.1	-1.3	-5.6	-1.2	-0.2	-2.4	-0.8
ナイロン	3412.4	-17.2	-4.0	-1.1	1.7	-5.2	1.6	0.2	-1.8	-0.9
	3432.6	-16.4	-4.0	-1.3	2.0	-5.6	2.1	0.4	-2.4	-0.6
	3423.6	-16.3	-4.3	-1.0	2.2	-5.8	0.6	1.4	-2.6	-0.7
	3424.2	-16.1	-4.0	-1.3	3.0	-6.5	2.0	0.1	-2.7	-0.9

⑤ 安定化条件の選択

以上の結果より、温度 20℃及び相対湿度 50%という秤量を行う試験室に近い環境であり、しかも試料に対して穏やかに作用する硫酸デシケーター法が、試料の安定化に最適であることが判明した。合成樹脂やゴムの中でも安定化しにくいポリ塩化ビニル、シリコーンゴム、天然ゴム、ナイロンなどでも良好な結果が得られたことから、多くの合成樹脂やゴムに適していると考えられた。そこで、質量測定における試料の安定化条件は、43.4%

硫酸を用いた硫酸デシケーター (20±1℃、相対湿度 50±2%) 法とした。

3) 恒量の定義と定量下限

恒量について、EN 規格ではおよそ 24 時間の間隔で質量測定を行い、連続した質量差が 2 mg/dm² の範囲内に収まった時の質量と規定している。

一方、JIS K 0067 化学製品の減量及び残分試験方法 (1992)⁴⁾では、1回目と2回目の質量の差が1回目の質量の0.10%以下、ただし、試料の質量が0.3 g 以下の場合は差が0.3 mg

以下になったときを恒量と定義している。また、日本薬局方⁵⁾では、前後の秤量差が前に量った質量の0.10%以下、ただし、秤量差が、化学はかりを用いたとき0.5 mg以下、セミマイクロ化学はかりを用いたとき0.05 mg以下、マイクロ化学はかりを用いたとき0.005 mg以下の場合を恒量と規定している。

今回使用した試料の初期質量は100～7000 mgであり、恒量の許容範囲をJIS K 0067や薬局方が定める質量の0.10%とすると0.1～7 mg以下である。ただし、JIS K 0067に従えば0.3 mg、日本薬局方に従えば化学はかりを用いた場合の0.5 mgが下限となる。

一方、EN規格では100 cm²の試料あたり2 mg以下を恒量としていることから、許容誤差は20 µg/cm²となる。植物油総溶出量試験では、試料質量を溶出前後の2回測定し、その差を植物油の残留量で補正して総溶出量を求める。そのため、許容誤差を2倍含むことになり40 µg/cm²となる。植物油残留量の定量下限がこれより十分に低ければ植物油総溶出量試験の定量下限は40 µg/cm²となる。

しかし、これは蒸発残留物試験の規格値や平成24年度厚生労働科学研究報告書⁶⁾で提案した50 µg/cm²から考えると十分ではない。もし恒量の許容範囲を0.5 mg以下に設定できれば、EN規格の1/4となり、定量下限を10 µg/cm²に引き下げることができる。この値であれば50 µg/cm²が規格値であっても試験可能である。定量下限をさらに引き下げる必要があれば、試料量を増やすことにより対応できる。

今回採用した硫酸デシケーター(20℃、相対湿度50%)法では、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルでは全ての検体で1回目から質量差は0.5 mg以下であり、安定化が難しい天然ゴム、シリコンゴム、ナイロンでもほぼ1週間、長くても2週間以内に

変動は0.5 mg以下となった。このことから、質量差0.5 mg以下を恒量としても十分に試験可能と考えられた。

以上のことから、恒量における質量差の許容範囲は薬局方の化学はかりを使用した場合と同じ0.5 mg以下と設定した。

3. 植物油定量法の検討

1) 植物油のメチルエステル化法

① 三フッ化ホウ素メタノール法

植物油総溶出量試験では、溶出試験前後の試料の質量差とともに、溶出後の試料中に残存する植物油量が必要となる。

EN規格では、試料中に残存する植物油をソックスレーで抽出したのち、三フッ化ホウ素メタノール法でメチルエステル化してGC-FIDで定量する。三フッ化ホウ素メタノール法は、最初に植物油をアルカリ性メタノール下で還流してエステル結合を切断し、グリセロールと脂肪酸に分解する。これに三フッ化ホウ素メタノールを加えて還流し、脂肪酸をメチルエステル化する。

三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液はメチルエステル化の反応力が極めて高い。しかし、有害性も高く、目、粘膜、皮膚を侵食し、吸入により気管や肺の粘膜を浸食すると肺水腫や呼吸困難を引き起こすため、EU分類では猛毒(T+)に分類されている。

② ナトリウムメトキシド法

三フッ化ホウ素メタノールを使用しないメチルエステル化法としてナトリウムメトキシド法がある。ナトリウムメトキシドの存在下、脂肪はメタノールとのエステル交換反応により、直接脂肪酸メチルエステルを生成する。この反応はトリグリセリドで最も反応しやすく、次いでジグリセリド、モノグリセリドの順である。

ナトリウムメトキシド法は三フッ化ホウ

素メタノールのような有害試薬は使用せず、反応は穏やかであり、操作も簡便である。日本薬局方にも収載され、平成 20 及び 21 年度厚生労働科学研究^{2,7)}のオリブ油溶出試験の改良でも使用した。そこで、このナトリウムメトキシド法を採用することとし、各種試験条件を検討した。

2) ナトリウムメトキシド法の反応条件の検討

オリブ油 500 mg 相当量を用い、ナトリウムメトキシド溶液の添加量及び反応終了条件、反応時の振とうの影響、反応時間、反応温度、メタノール添加量等の検討を行った。

なお、ナトリウムメトキシドはメタノールに金属ナトリウムを溶解して生成するが、生成反応には安全性の懸念があることから、市販のナトリウムメトキシド溶液を用いた。各種濃度の溶液が販売されているが、入手が容易で価格も安価な和光純薬工業製 28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液を使用した。

① 反応終了条件

メチルエステル化反応では、反応終了時に水を添加して過剰のナトリウムメトキシドを分解する。そこで、ナトリウムメトキシド溶液を 0.1~5 ml 添加して反応を行い、反応終了時に水 5 ml を添加したところ、いずれのナトリウムメトキシド量でもヘプタン層が乳濁し、試験溶液が採取できなかった。

ヘプタン層の乳濁を抑えるために、水の増量や酸の添加等を検討した。その結果、水とともに酢酸 0.5 ml を添加すると、ナトリウムメトキシド溶液 1 ml 以下では界面の乳濁がほとんどない良好な分離が得られた。また、水添加量を 2 ml にしても、酢酸を添加していれば界面の分離やメチルエステル体の生成率に影響は見られなかった。

しかし、ヘプタン層とのバランスや分解を確実にを行うため、反応終了時には水 5 ml 及び

酢酸 0.5 ml を加えることとした。

② ナトリウムメトキシド溶液の添加量及び振とう操作

ナトリウムメトキシド溶液の添加量及び振とうの有無、振とう方法に関する検討結果を表 5 及び図 3 に示した。

オリブ油 500 mg 相当の残留物を用い、ナトリウムメトキシド溶液を 0.1、0.5、1、2 及び 5 ml 添加し、振とうせずに室温で 1 時間放置したところ、メチルエステル体の生成率はナトリウムメトキシド溶液 1 ml 添加で 49.9%、2 ml 添加で 51.9%、5 ml 添加して

表 5 ナトリウムメトキシド溶液の添加量と振とうの検討

振とう	メトキシド量(ml)	水添加量(ml)	メチルエステル体生成率(%)
手振とう	5	5	88.1±2.8
	2		93.3±0.8
	1		94.6±1.4
	0.5		97.2±2.3
	0.1		65.2±13.2
振とうなし	5	5	80.8±9.2
	2		51.9±9.8
	1		49.9±4.4
	0.5		41.5±6.1
	0.1		22.8±1.8
手振とう	1	2	95.5±1.9
	0.5		97.2±1.9
	0.3		93.5±5.8
機械振とう	1	2	96.0±1.6
	0.5		97.9±2.2
	0.3		97.8±1.9

反応温度：室温、反応時間：60 分間、メタノール添加：無し

メチルエステル体生成率(%) = ナトリウムメトキシド法のピーク面積 / 三フッ化ホウ素法のピーク面積 × 100 (3 または 4 試行の平均値 ± SD)

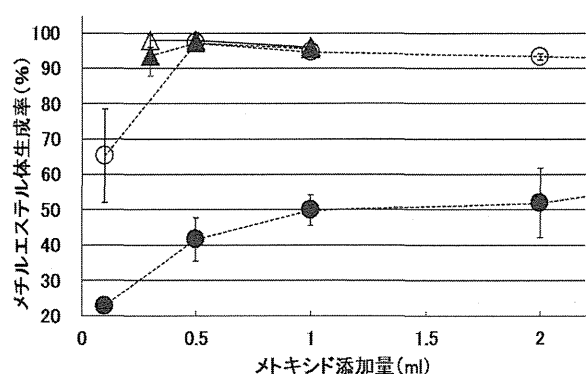


図3 メトキシド溶液添加量及び振とうの影響 ●：振とうなし ○：手振とう ▲：手振とう、△：機械振とう

も80.8%と低かった。一方、10分毎に軽く手で振とうを加えると、0.1 mlでは65.2%であったが、0.5 mlで97.2%に達した。すなわち、振とうを加えることで反応が飛躍的に促進されることが判明した。

ただし、添加量1 ml以上ではメチルエステル体生成率はやや減少した。これは、ナトリウムメトキシド量が多くなると、酢酸0.5 mlを添加してもヘプタン層と水層の間にエマルジョンが生じ、これにメチルエステル体を取り込まれてたためと推測された。

さらにナトリウムメトキシド溶液量と振とう方法を検討するため、ナトリウムメトキシド溶液を0.3、0.5及び1 ml添加し、手振とうと機械振とう(100 rpm)を比較した。また、水の添加量は2 mlとした。その結果、手振とうにおけるメチルエステル体生成率は0.3 ml添加ではやや低かったが、0.5及び1 mlではいずれも95%以上で、前述の試験結果とよく一致した。また、機械振とうでは手振とうと同等かやや高い生成率が得られた。また、いずれもナトリウムメトキシド0.5 ml添加の生成率が最も高かった。

以上のことから、メチルエステル化反応を効率よく行うには振とうが必須であり、手振

とうよりも機械振とうの方がメチルエステル体生成率がやや高く、しかも操作が簡便であることから機械振とうを採用した。

また、ナトリウムメトキシド溶液の添加量については、手振とう、機械振とうともに0.5 ml添加時の生成率が最も高かったことから、添加量は0.5 mlとした。

③ 反応温度及び反応時間

メチルエステル化反応の最適温度及び最適時間を検討するため、ナトリウムメトキシド溶液0.5 mlを添加し、室温(約21℃)または水槽(18及び40℃)でいずれも機械振とうをしながら5~60分間反応させ、メチルエステル体生成率を比較した(表6、図4)。

いずれの反応条件においてもメチルエステル体の生成率は90%以上と高かったが、中でも室温15及び30分間で98%と高かった。

表6 反応温度及び反応時間の検討

反応温度	反応時間 (分)	メチルエステル体生成率 (%)
室温 (約21℃)	60	96.2±0.1
	30	97.9±0.9
	15	97.7±2.5
	5	95.3±4.1
水 (18℃)	60	97.0±1.3
	30	96.4±1.3
	15	97.1±0.8
	5	92.5±2.8
温水 (40℃)	60	91.6±3.1
	30	93.5±1.4
	15	95.5±0.7
	5	96.0±4.3

ナトリウムメトキシド溶液量：0.5 ml、メタノール添加：無し、振とう：機械振とう、水添加量：2 ml

メチルエステル体生成率(%)=ナトリウムメトキシド法のピーク面積/三フッ化ホウ素メタノール法のピーク面積×100 (3試行の平均値±SD)