

図4 反応時間と反応温度の影響

● : 室温 ○ : 40°C、▲ : 18°C

室温では最初の5分間で2検体は96%を超えていたが、1検体がやや低く、そのため平均値が下がりばらつきがやや高くなった。また、60分間後には低下が見られた。

一方、反応温度 18°C の場合は室温よりやや低いがほぼ同程度の生成率を示した。しかし、反応温度 40°C の場合、5分間では他の条件より高い生成率であるが、時間の経過とともに低下した。

以上のことから、メチルエステル化の反応温度及び反応時間は、室温で15分間が最適であった。

④ メタノール添加量の検討

ナトリウムメトキシド溶液によるメチルエステル化反応は、メタノール量が多いほどメチルエステル体生成率は高くなることから、一般にメタノール量は大過剰にしておく。ナトリウムメトキシド溶液はメタノールで調製されており、これがメチルエステル化反応のメタノール源となるが、今回使用した試薬はナトリウムメトキシド濃度が28%と高く、ナトリウムメトキシドに対するメタノールの比率が低い。そこで、さらにメタノールを添加することによりメチルエステル化体の生成率が変化するか検討した。

ナトリウムメトキシド溶液 0.5 ml に 0~2

ml のメタノールを添加してメチルエステル化体の生成率を検討した (表7、図5)。

その結果、メタノールを添加しなくてもメチルエステル体生成率は95.6%あったが、メタノール量の増加とともにさらに生成率が上昇し、1.5及び2 ml 添加では99%以上となった。そこで、メタノールは生成率が高く、しかも測定値のばらつきが少ない2 ml を添加することとした。

表7 メタノール添加量の検討

メタノール添加量 (ml)	メチルエステル体生成率 (%)
0	95.6±1.1
0.5	98.0±1.1
1	98.4±1.0
1.5	99.4±0.9
2	99.2±0.1

振とう：機械振とう、反応温度：室温、反応時間：60分間、ナトリウムメトキシド溶液量：0.5 ml、水添加量：5 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)

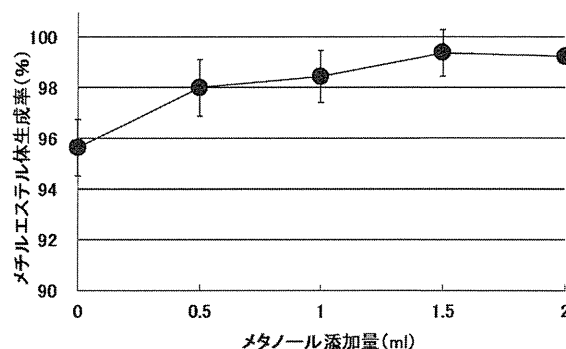


図5 メタノール添加量の影響

⑤ メチルエステル化反応条件の設定

ナトリウムメトキシドによるメチルエステル化の反応条件を検討し、B. 研究方法6.

1) ナトリウムメトキシド法に示す試験条件を設定した。

ナトリウムメトキシドによるメチルエステル体生成率は、メタノール 2 ml を添加しても 99.2% であり、三フッ化ホウ素メタノール法をわずかに下回った。その原因として、三フッ化ホウ素メタノール溶液は、脂肪をアルカリ分解した後の脂肪酸と反応するため、オリブ油中のトリグリセリドだけでなく不純物として存在する遊離脂肪酸やモノ、ジグリセリドとも反応する。一方、ナトリウムメトキシドはエステル交換反応のため、トリグリセリドとの反応率は極めて高いが、モノ、ジグリセリドとの反応率は低く、遊離脂肪酸とはほとんど反応しない。そのため、オリブ油の不純物である遊離脂肪酸がメチルエステル化されないため、脂肪酸メチルエステル体生成率がわずかに低くなると推定された。

しかし、実際の植物油総溶出量試験では、植物油を用いて検量線を作成するため、遊離脂肪酸の影響は受けず、正しく定量されることになる。

3) メチルエステル体の GC-FID による測定

① 測定対象ピーク

溶出後の試料に残存している植物油は、抽出してメチルエステル化されたのち GC-FID で定量される。

オリブ油の脂肪酸組成は、オレイン酸が約 70% と最も多く、次いでパルミチン酸約 14%、リノール酸約 10%、そのほかにステアリン酸、リノレン酸などである。そのため、オリブ油をメチルエステル化すると、それぞれの脂肪酸のメチルエステル体が生成し、GC-FID のクロマトグラム上には複数のピークが出現する。定量にあたっては、それらの主ピークであるオレイン酸メチルを指標として定量する。ただし、溶出前の試料からオレイン酸メチルに一致するピークが検出された場合には、それ以外の試料に存在しないピークを用いて定量を行う。その場合には複数のピークの合計を

用いる場合もある。また、オリブ油のいずれのピークも試料中のピークと重なる場合には、オリブ油以外の植物油を使用し、最適なピークを測定対象とする。

② 測定条件の検討

脂肪酸エステルの分析には、一般に Wax 系の強極性カラムが用いられる。そこで、InertCap WAX (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm) の条件 1 を用いて前述のナトリウムメトキシド法の反応条件の検討を行った。図 4 に示すようにオリブ油 500 mg 以下ではオレイン酸メチルは他の小さなピークと良好に分離し、0.5 mg でも S/N 比は 50 以上あり感度も良好であった。しかし、反応の直線性と検量線を検討するためオリブ油量を 1000 及び 1500 mg に増加したところ、オレイン酸メチルと直前のステアリン酸メチルのピーク分離が悪くなり、定量性が低下した。そのため、カラム温度やキャリアガス流量を変更したが良好な分離は得られなかった。

そこで、DB-WAX (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.5 μm) を用いて検討を行ったところ、条件 1 と同じカラム温度やキャリアガス流量でも良好な分離が得られた。さらに、カラム温度を 100°C で 2 分間保持後、20°C/min で昇温して 250°C で 5 分間保持し、オレイン酸メチルの保持時間を 11.1 分に短縮しても十分に良好な分離が得られた (図 5)。これにより、1 検体の測定時間はほぼ 15 分に短縮された。また、本カラムは食品衛生法のポリスチレンにおける揮発性物質の規格試験のカラムと同一であり、汎用性も高い。

以上のことから、オリブ油メチルエステル体の GC-FID 測定条件は、DB-WAX (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.5 μm) を用い、カラム温度は 100°C で 2 分間保持したのち、20°C/min で昇温して 250°C とし 5 分間保持、キャリアガス流量は 2.0 ml/min とした。

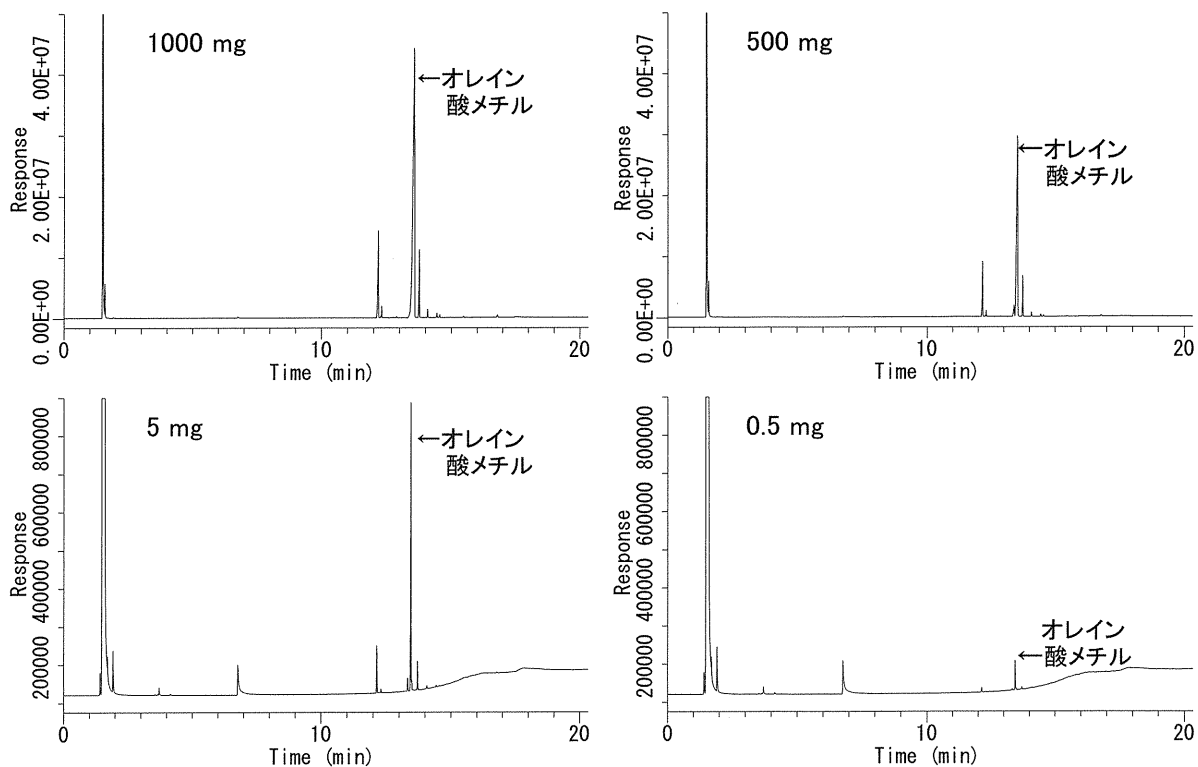


図4 オリーブ油メチルエステル体のガスクロマトグラム (InertCap WAX)

カラム : InertCap WAX 0.32 mm×30 m, 0.25 μ m ; キャリアガス : 2.3 ml/min
 カラム温度 : 50°C (2 min) → 15°C/min → 250°C (5 min)

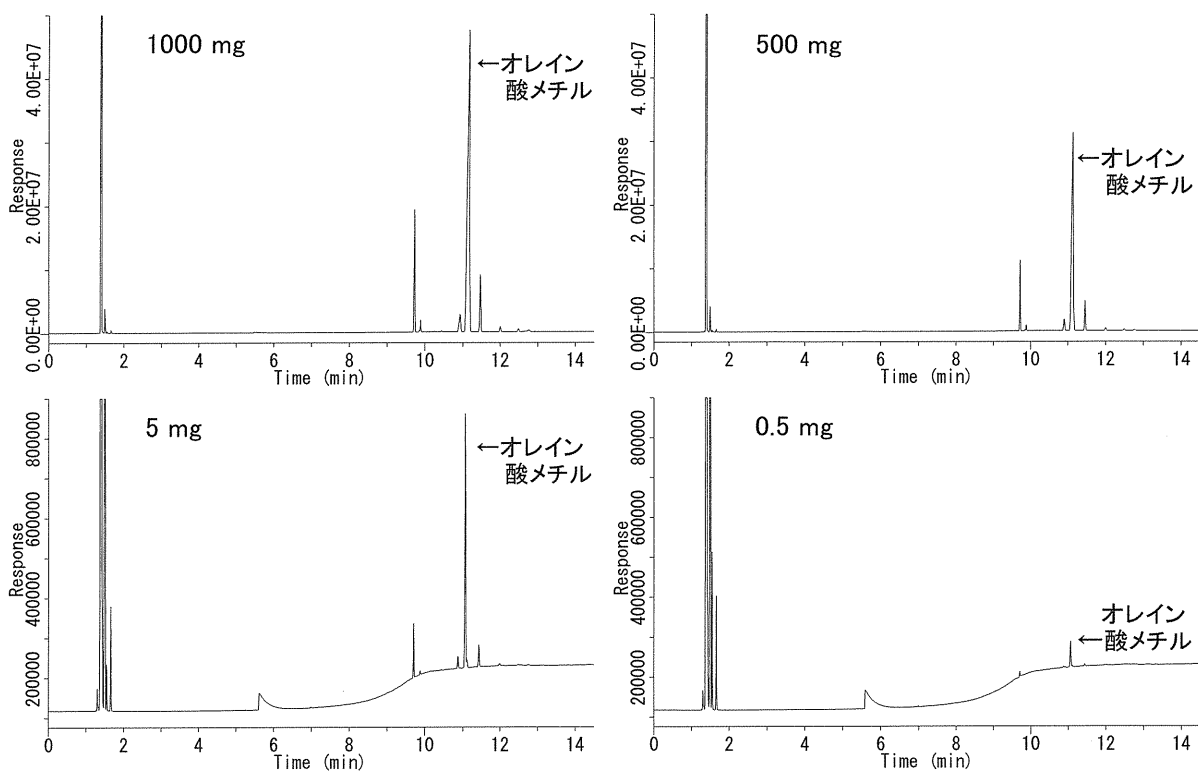


図5 オリーブ油メチルエステル体のガスクロマトグラム (DB-WAX)

カラム : DB-WAX 0.25 mm×30 m, 0.5 μ m ; キャリアガス : 2.0 ml/min
 カラム温度 : 100°C (2 min) → 20°C/min → 250°C (5 min)

4) 反応の直線性と定量範囲

設定されたナトリウムメトキシド溶液によるメチルエステル化法を用いて、オリーブ油 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 及び 1500 mg をナトリウムメトキシドでメチルエステル化して、横軸をオリーブ油量、縦軸をピーク面積とする検量線を作成し、その直線性と定量範囲を検証した。

得られた検量線は全範囲を通じて良好な直線性を示した ($R^2=0.9957$) (図6)。すなわち、GC-FID 測定における直線性が高いだけでなく、メチルエステル化の反応率も一定であり定量性が高いことが示された。

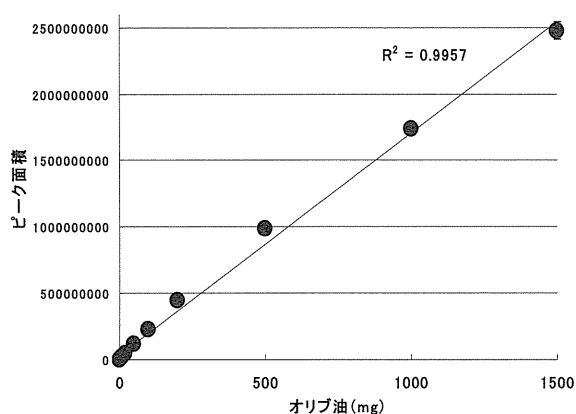


図6 検量線(オリーブ油 0.5~1500 mg)

また、今回の検討では、測定した最小量である 0.5 mg まで極めてきれいな直線性が得られたことからこれを定量下限とした。しかし、ガスクロマトグラム上の 0.5 mg のピークシグナルとノイズの比 (S/N 比) は 10 よりもかなり大きく、定量下限の引き下げも可能と考えられることから、来年度さらに検討を行う。

植物油溶出試験で試料中に残存する植物油量は、合成樹脂では 100cm²あたり 1 mg 以下の場合もあるが、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどでは数十~数百 mg 程度となり、ゴム製品では 1000 mg を超えることも少なくない。

EN 規格では、オリーブ油含有量が 100 mg を超えると三フッ化ホウ素メタノール法によるメチルエステル化の反応率が低下するため、抽出物が多い場合にはその一部を用いてメチルエステル化を行うように定めている。しかし、内標準の濃度を一定にするために、数倍の内標準を加えて抽出操作からやり直す必要があり煩雑である。一方、本法では 1500 mg のオリーブ油まで定量可能であり、一回の試験操作でほぼすべての試料の定量が可能である。

検量線の直線性について詳細に検討すると、500 mg より高濃度側ではピーク面積がやや低い傾向が見られた。また検量線の濃度範囲が広いと低濃度側の結果が反映されにくい。そこで、低濃度 (0.5~10 mg)、中濃度 (10~200 mg)、高濃度 (200~1500 mg) に分割して、それぞれの検量線の作成を試みた (図7~9)。

その結果、低濃度領域では $R^2=1$ 、中濃度領域では $R^2=0.9999$ と極めて良好な直線性があり、しかもほぼ原点を通る検量線が得られた。また、高濃度領域でも $R^2=0.9984$ と 1500 mg まで良好な直線性が得られた。すなわち、定量用の検量線を絶対検量線法で作成する場合には、試料中の残存植物油量近傍の濃度範囲で作成することにより、定量精度がさらに高まることが示された。

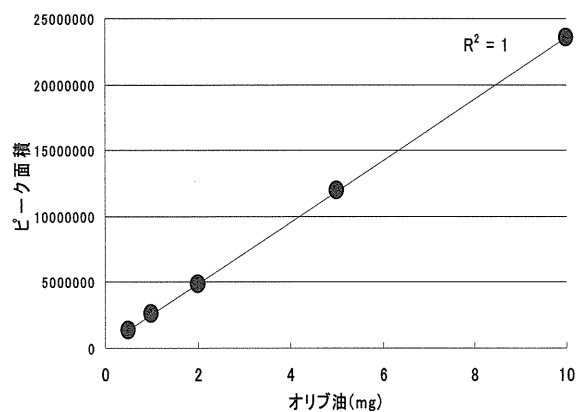


図7 低濃度検量線(オリーブ油 0.5~10 mg)

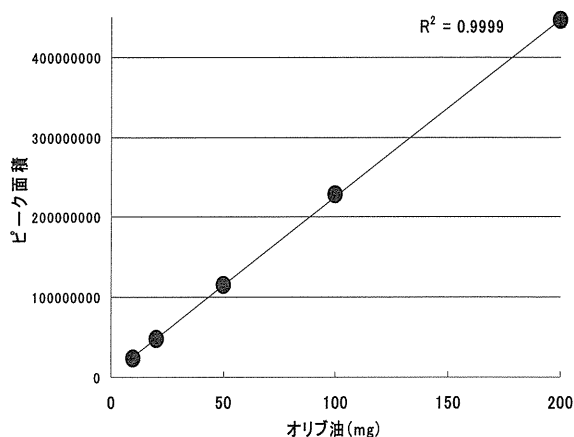


図8 中濃度検量線(オリブ油 10~200 mg)

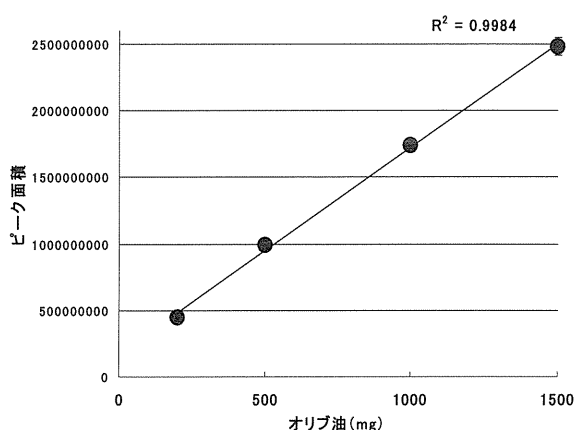


図9 高濃度検量線(オリブ油 200~1500 mg)

D. 結論

植物油総溶出量試験法の改良の一環として、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。

その結果、試料の恒量化においては43.4%硫酸を用いた温度20℃、相対湿度50%の硫酸デシケーターによる安定化が所要期間も短く変動も少なく最適であった。本条件により、材質中の水分含量や揮発性成分量が高いため安定化に長時間を要したポリ塩化ビニル、ナイロン、シリコーンゴム、天然ゴムでも短期間で安定化することができた。

また、本条件であれば、恒量をEN規格の

1/4に相当する0.5 mg以下に設定することが可能であった。これにより、表面積100 cm²の試料を使用した場合の定量下限は5 µg/cm²となる。植物油総溶出量試験では、試料の質量測定を溶出前後の2回行うことから、その質量差における定量下限は10 µg/cm²である。

一方、植物油の定量法に関する検討では、メチルエステル化にナトリウムメトキシド法を採用した。脂肪残留物をヘプタン10 mlに溶解し、28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液0.5 ml、メタノール2 mlを添加して室温で15分間振とうしながら反応を行った。また、水5 mlと酢酸0.5 mlを加えて5分間振とうすることにより反応を終了させた。得られたメチルエステル体生成率は三フッ化ホウ素メタノール法と同等であった。

ナトリウムメトキシド法は三フッ化ホウ素メタノール法と比較して、有害試薬を用いず、簡便で、しかもオリブ油0.5~1500 mgという広範囲で直線性があり優れた方法であった。

来年度は試料に残留する植物油の抽出条件を検討して植物油総溶出量試験法を確立し、EN規格との比較により試験法の妥当性を検証する予定である。

E. 参考文献

- 1) EN 1186-2:2002 Materials and articles in contact with foodstuffs-Plastics Part 2: Test methods for overall migration into olive oil by total immersion (2002)
- 2) 河村葉子ら：平成20年度厚生労働科学研究費補助金 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総括・分担研究報告書，31-36 (2009)
- 3) JIS Z 0701-1977 包装用シリカゲル乾燥剤 (1977)

- 4) JIS K 0067-1992 化学製品の減量及び残分
試験方法 (1992) る研究総括・分担研究報告書, 29-32
(2010)
- 5) 厚生労働省 第十六改正日本薬局方
(2011) F. 健康被害情報
なし
- 6) 河村葉子ら:平成 24 年度厚生労働科学研究
費補助金 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総
括・分担研究報告書, 13-47 (2013) G. 研究発表
なし
- 7) 河村葉子ら:平成 21 年度厚生労働科学研究
費補助金 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
る研究総括・分担研究報告書, 29-32
(2010) H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

