

図2 オリブ油検量線(0.05~1500 mg)

以上のように、内標準法、絶対検量線法ともオリブ油の定量限界は 0.05 mg であり、0.05 ~1500 mg の範囲で良好な直線性を示し定量可能であった。また、内標準法による検量線は、絶対検量線法よりもさらに直線性にすぐれていた。

2) サフラワー油の定量限界と検量線

溶出前試料のガスクロマトグラムにおいて、オレイン酸メチルの位置に試料由来の妨害ピークが存在する場合には、それ以外のピークを定量に用いる必要がある。オリブ油の脂肪酸組成はオレイン酸 77.3%、パルミチン酸メチルやリノール酸メチルの位置に妨害ピークがなければ、オリブ油のこれらを定量用ピークとすることも可能であるが、ピークが小さいため定量感度が低下する。

一方、サフラワー油（ベニバナ油、高リノール酸）の脂肪酸組成はリノール酸 75.7%、オレイン酸 13.5%である²⁾。そのため、サフラワー油を用いて溶出を行い、リノール酸メチルを定量用ピークとすれば、オリブ油のオレイン酸メチルと同程度の定量感度が期待できる。そこで、サフラワー油による定量限界及び検量線について検討した。

サフラワー油 0.05 mg のガスクロマトグラムを図3に示した。リノール酸メチルのピーク（保持時間 11.3 分）は S/N 比が約 10 であり、ピーク形状も良好であった。そこで、サフラワー油の定量限界はオリブ油と同じ 0.05 mg とした。

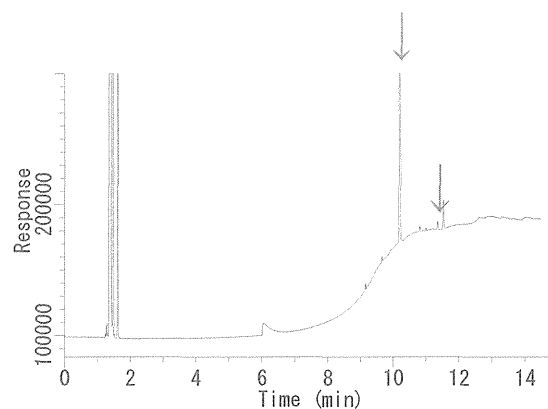


図3 サフラワー油(0.05 mg)のガスクロマトグラム 保持時間：内標準 10.2 min, リノール酸メチル 11.3 min

次に、サフラワー油 0.05~1500 mg の検量線を絶対検量線法で作成したところ、 R^2 は 0.9948 と良好な直線が得られた。さらに、内標準法で検量線を作成したところ、 R^2 は 0.9999 であり、極めて良好な直線性を示した(図4)。

以上のようにサフラワー油における定量限界は 0.05 mg、定量範囲は 0.05~1500 mg であり、植物油としてサフラワー油を用いてもオリブ油と感度や定量性に差がないことが示された。

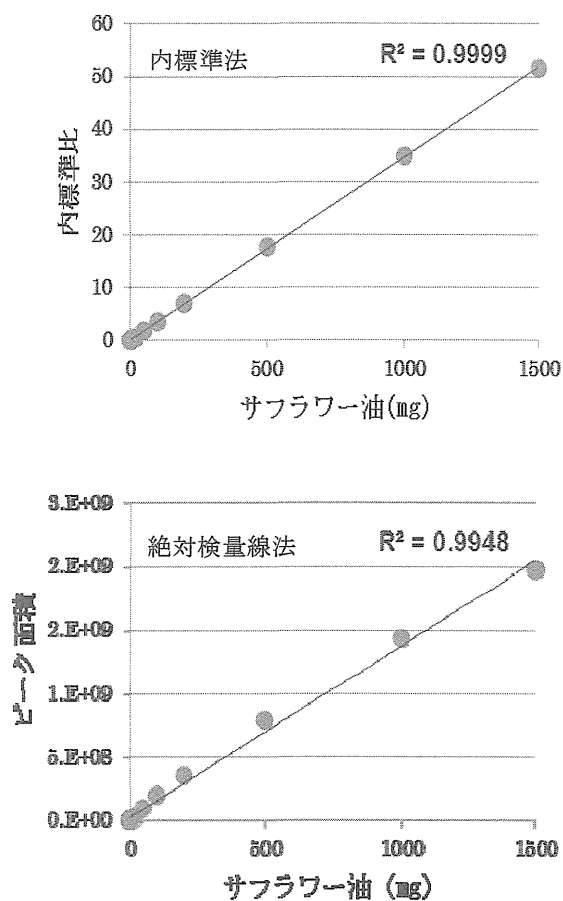


図4 サフラワー油検量線 (0.05~1500 mg)

2. 試料中の残存植物油の抽出法の検討

1) シリコーンゴムにおける抽出条件の検討

EN法ではソックスレー抽出器を用いて7時間抽出を行い、その後植物油が検出されなくなるまで7時間の抽出を繰り返すように定めている。そのため、最低でも7時間の抽出を2回、試料によってはそれを何度も繰り返す必要があり、試験時間が長くなる要因の一つである。

試料に残存する植物油は、加温した溶媒に浸漬するという簡便な方法によっても抽出可能である。抽出時に植物油と化学構造が類似した内標準を加えることにより、両者の分布が平衡に達すれば抽出液中の存在比から試料中に残存していた植物油量を算出できると考えられる。そうであれば試料中の植物油を全

量抽出する必要はなく、抽出に要する時間を大幅に削減することができる。

そこで、試料に植物油が大量に残存しやすく、しかも抽出時に溶媒を吸収して膨潤し、植物油の抽出に時間を要するシリコーンゴムを用いて、浸漬法による植物油の抽出を試み、抽出溶媒、抽出温度、抽出時間、抽出回数などを検討した。

① 抽出試験用試料

試料中の残存植物油の抽出条件を比較検討するために、植物油をほぼ一定量含有する試料を調製する必要があった。予試験の結果、シリコーンゴムシートはガスクロマトグラム上にオリブ油の定量を妨げるピークが存在しなかったことから、植物油としてオリブ油を使用し、その定量用ピークとしてオレイン酸メチルを用いた。また、溶出条件は食品衛生法で規定されている一般的な条件である60°C30分間とした。シリコーンゴムシート10cm×10cm(表面積200cm²)を用い、以上の条件で4)②~④に従って操作し、抽出試験用試料を調製した。

② 抽出溶媒

植物油の抽出溶媒としてクロロホルム・メタノール混液が汎用されるが³⁾、クロロホルムはその有害性から望ましくない。一方、EN法ではソックスレー抽出の溶媒としてペンタン、極性の高い樹脂にはペンタン・エタノール(95:5)を使用している。しかし、ペンタンは沸点が36.1°Cと低いため、操作中に揮散するおそれがある。

そこで、植物油の溶解性がペンタンと同様に高く、しかも沸点は68°Cとペンタンより揮散しにくいヘキサン、これにエタノールを添加したヘキサン・エタノール(95:5)、著者らが合成樹脂やゴム中の添加剤の抽出に混液としてしばしば使用するシクロヘキサン⁴⁻⁷⁾を検討対象の溶媒とした。抽出温度は揮散が少な

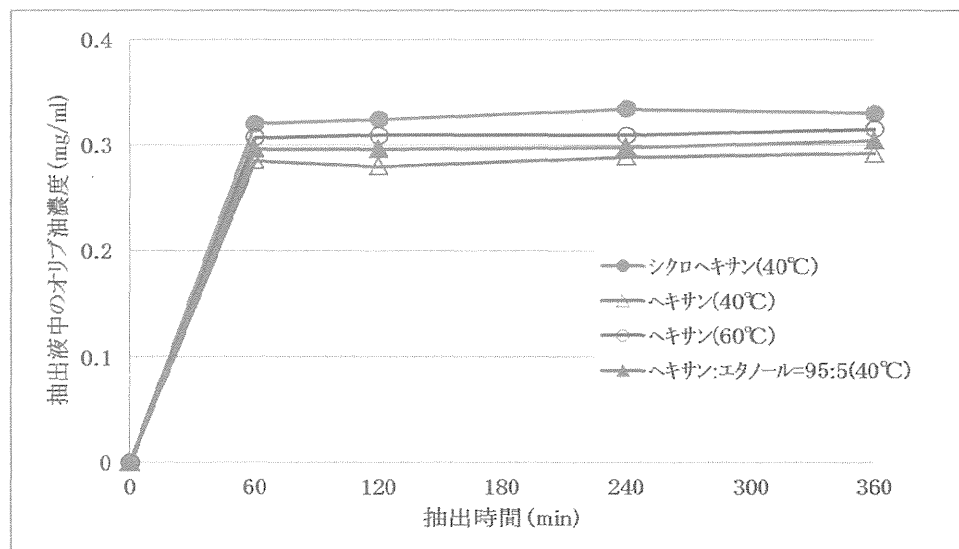


図5 各抽出条件における抽出液中のオリブ油濃度の経時変化

く操作も簡便な 40°Cとし、ヘキサンでは 60°Cも試みた。抽出操作開始後、0、60、120、240、360 分後に抽出液を採取してオリブ油濃度を測定した(図5)。抽出液中のオリブ油濃度は、いずれの抽出溶媒でも 60 分間ですでにほぼ平衡に達しており、その濃度も同程度であった。その中でもシクロヘキサンが最も濃度が高く、次いでヘキサン(60°C)、ヘキサン・エタノール(95:5)であり、ヘキサン(40°C)が最も低かった。

シクロヘキサンは抽出力が強いだけでな

く、沸点が 80.7°Cであるため 40°Cで 6 時間加温してもほとんど揮散しなかった。そこで、抽出溶媒としてシクロヘキサンを選択した。

③ 抽出時間

次に、シクロヘキサンを用いた場合の抽出時間を検討するため、40°Cで 0~360 分間の振とう抽出を行い、絶対検量線法により求めた抽出液中のオリブ油濃度から抽出されたオリブ油量を算出した。また、内標準法によりオリブ油と内標準の存在比から

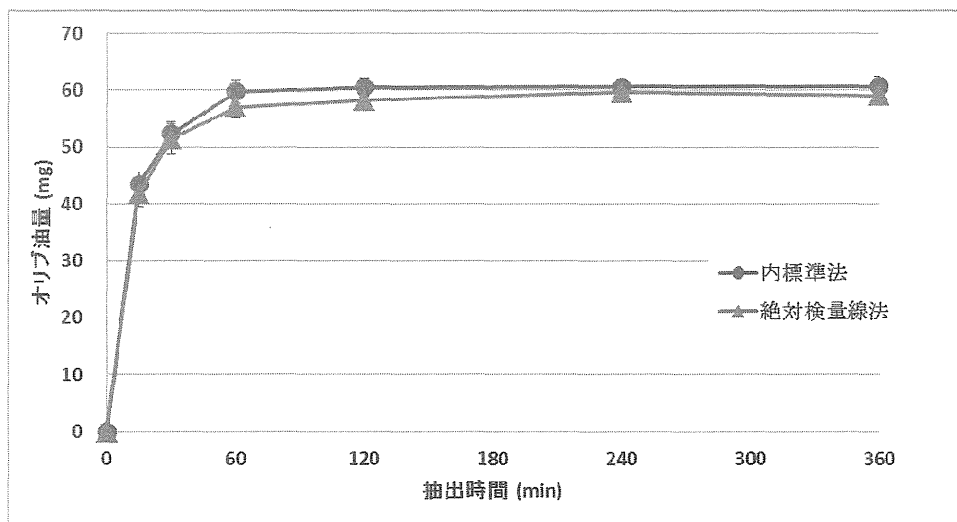


図6 シクロヘキサン 40°Cにおけるオリブ油量の経時変化

オリブ油量を算出した。それらの経時変化を図6に示した。

絶対検量線法により求めた抽出液中のオリブ油量は60分間でほぼプラトーに達し、その後わずかに増加しながら240分後には59.6 mgに達した。一方、内標準法によるオリブ油量は、60分後にプラトーに達し、その後はほぼ60.5 mgで一定であった。

以上のように、抽出されたオリブ油量は60分間でほぼ平衡に達しており、しかも絶対検量線法と内標準法で求められたオリブ油量がほぼ一致していることから、試料中のオリブ油は60分間でほぼ全量抽出されたと推測された。

④ 抽出回数

シクロヘキサン 40°C 120 分間の振とう抽出により完全に抽出されているか確認するため、40°Cで120分間振とう抽出後、新たなシクロヘキサン 200 ml を加えて60分間の振とう抽出を3回繰り返し、各抽出液中のオリブ油量を絶対検量線法で測定した(表1)。

抽出されたオリブ油量は、1回目で53.16 mg (合計量の96.6%)であった。さらに、2回目で1.70 mg (3.1%)、3回目で0.15 mg (0.2%)抽出され、4回目で定量限界未満と

なった。EN法では抽出液中の植物油量が定量限界以下になるまで抽出を繰り返すように規定している。それに準ずるならば3回以上抽出を行う必要がある。

次に、1回目の抽出液、1回目と2回目を合わせた抽出液、1~3回目を合わせた抽出液をそれぞれGC-FIDで測定し、絶対検量線法と内標準法でオリブ油量を定量した(表2)。

絶対検量線法では抽出回数が増えると抽出量は増加し、1~3回を合わせた抽出液では57.15 mgに達した。一方、内標準法では1回目のみでも抽出回数を増やしてもオリブ油量は57.76 ~ 57.95 mgで変化がなかった。

すなわち、内標準を用いれば、1回の抽出で全オリブ油量が算出でき、それ以上抽出を行う必要がないことが示された。さらに、内標準法では抽出時から内標準を添加するため、抽出効率の差も補正される。そのため、定量値の標準偏差も小さくなっており、より精度の高い定量が可能と考えられる。

以上のことから、シリコーンゴム試料に残存するオリブ油は、シクロヘキサンを用いて40°C 120分間の振とう抽出を1回のみ行い、定量は内標準法で行うこととした。

表1 シリコーンゴムを4回抽出時の各抽出液中のオリブ油量

	抽出1回目	抽出2回目	抽出3回目	抽出4回目	合計
オリブ油量(mg)	53.16±1.03	1.70±0.05	0.15±0.01	ND	55.01±1.05
オリブ油量(%)	96.6	3.1	0.3	0	100

各3試行で試験を行い、平均値±標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg

表2 シリコーンゴム抽出液を合わせた時のオリブ油量

定量法	オリブ油量 (mg)		
	抽出1回目	抽出1+2回	抽出1~3回
絶対検量線法	53.16±1.03	56.17±0.54	57.15±0.56
内標準法	57.95±0.33	57.76±0.27	57.91±0.08

各3試行で試験を行い、平均値±標準偏差で記載した。

2) ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンにおける抽出条件の検討

① 抽出試験用試料の調製

ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンの抽出条件を検討するため、まず、これらの抽出試験用試料を作成した。

予試験の結果、これらの試料はガスクロマトグラム上にオリブ油の定量を妨げるピークは存在しなかったことから、植物油としてオリブ油を使用した。

オリブ油への溶出条件については、これらの材質の植物油残存量がそれほど多くないと予想されたことから、残存オリブ油量が多くなるように溶出温度はやや高めの 80℃とし、溶出時間も長めの 60 分間とした。

② 抽出条件の検討

シリコーンゴムで確立した抽出条件及び定量法が、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンにも適用可能か検討した。抽出試験用試料に内標準溶液 10 ml とシクロヘキサン 190 ml を加え、40℃の恒温振とう水槽で 120 分間振とう抽出した後、新たなシクロヘキサン 200 ml を用いて 40℃60 分間の抽出操作を 2 回繰り返し、オリブ油抽出量を測定した。

その結果、表 3 に示すようにポリエチレン及びポリプロピレンでは、1 回目に 16.58 及

び 10.50 mg のオリブ油が抽出されたが、2 回目以降は定量限界未満となり、1 回でほぼ全量抽出されていた。一方、ナイロンでは 1～3 回の抽出ではいずれも定量限界未満であり、試料中にオリブ油がほとんど残存していないことが確認された。

次に、1 回目の抽出液、1 回目と 2 回目を合わせた抽出液について絶対検量線法と内標準法でオリブ油量を定量した (表 3)。絶対検量線法では、ポリエチレンとポリプロピレンの 1 回目と 2 回目を合わせた抽出液はいずれも 1 回目の抽出液より若干増加しており、2 回目の抽出液は定量限界未満ではあったものの、さらに抽出されることが示された。そこで、絶対検量線法で測定するならば、抽出回数は 2 回以上が望ましいと考えられた。

一方、内標準法ではいずれの抽出液ともオリブ油量はほぼ一定であった。シリコーンゴムと同様に、抽出液中のオリブ油と内標準の存在比は 120 分間で平衡に達しており、これらの試料についても 1 回の抽出操作でオリブ油の全量が求められたと考えられる。

ナイロンについては、いずれの抽出液も定量限界未満であり抽出条件を確認することはできなかったが、オリブ油が残存していればポリエチレンやポリプロピレンと同様に抽出可能と推察された。

表 3 ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンにおける抽出回数とオリブ油量

材質	定量法	オリブ油量 (mg)			
		抽出 1 回目	抽出 2 回目	抽出 3 回目	抽出 1+2 回目
ポリエチレン	絶対検量線法	16.58±0.41	ND	ND	16.87±0.34
	内標準法	16.32±0.48	—	—	16.30±0.48
ポリプロピレン	絶対検量線法	10.50±0.26	ND	ND	10.66±0.27
	内標準法	11.06±0.34	—	—	11.02±0.32
ナイロン	絶対検量線法	ND	ND	ND	ND
	内標準法	ND	—	—	ND

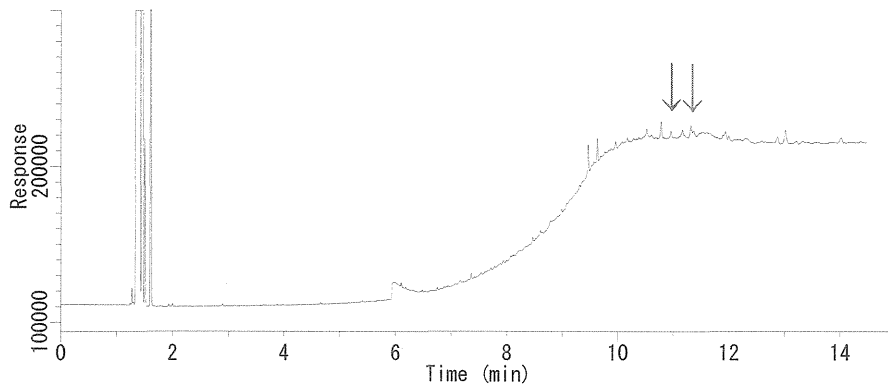
各 3 試行で試験を行い、平均値±標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg

3) 天然ゴムにおける抽出条件の検討

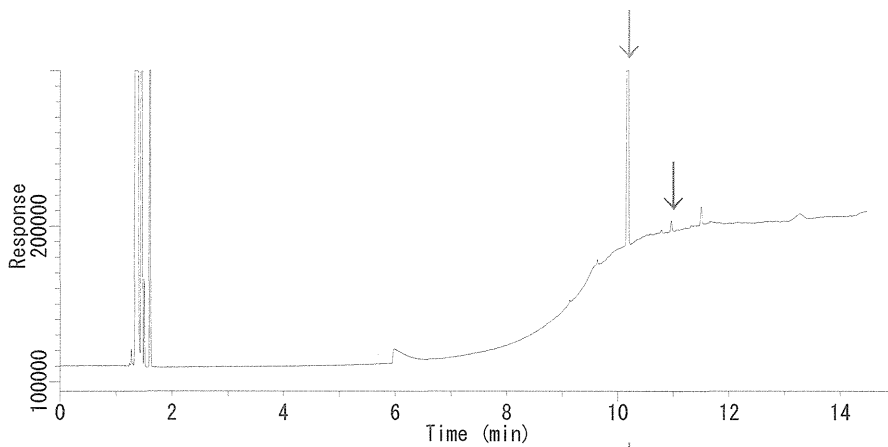
① 抽出試験用試料の調製

天然ゴムの抽出条件を検討するため、抽出試験用試料を作成した。これまでの経験から、EN 法による天然ゴムの試験において試料中の残存オリーブ油量が 500 mg を超過すること

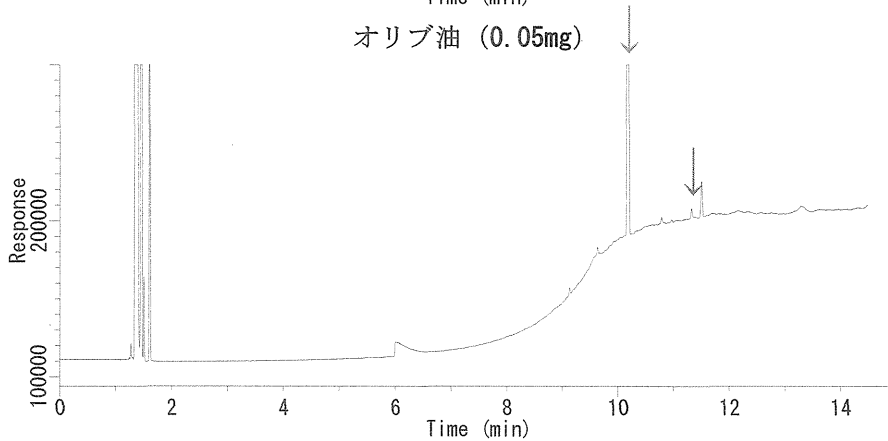
がしばしばあった。EN 法では、残存オリーブ油量が 500 mg を超えると定量できないため、試料サイズを小さくして試験をやりなおすように定めている。今回の改良法では 1500 mg まで定量可能であるが、両試験法の比較を行う際には同一サイズの試料を使用することが



天然ゴム (ブランク、3 cm×3 cm)



オリーブ油 (0.05mg)



サフラワー油 (0.05mg)

図7 天然ゴム試料ブランク、オリーブ油及びサフラワー油(各 0.05 mg)のガスクロマトグラム
保持時間：内標準 10.2 min、オレイン酸メチル 11.0 min、リノール酸メチル 11.3 min

望ましい。そこで、天然ゴムでは他の材質の約 1/10 である 3 cm×3 cm (表面積 18 cm²) の試料を用いて抽出用試料を調製することとした。

予試験として、この試料をシクロヘキサン 40℃120 分間で抽出したところ、図 7 に示すようにそれほど大きくはないが多数のピークが検出された。オリーブ油の定量用ピークであるオレイン酸メチル (保持時間 11.0 分) の位置にも妨害ピークが検出され、この面積はオリーブ油約 0.03 mg に相当した。一方、サフラワー油の定量用ピークであるリノール酸メチル (11.3 分) の位置にもサフラワー油約 0.05 mg に相当する妨害ピークが見られた。いずれの妨害ピークもそれほど大きくなかったが、オレイン酸メチルの位置の方が小さく、定量限界の 0.05 mg 未満であることから、植物油としてオリーブ油を使用することとした。

オリーブ油を用いて食品衛生法の溶出条件である 60℃30 分間で抽出用試料を調製したところ、残存オリーブ油量は約 50 mg であり EN 法の規定内であった。また、妨害ピーク約 0.03 mg は残存オリーブ油量の 0.06% に過ぎず、定量には影響がないことが確認された。

以上のことから、天然ゴムの抽出試験用試料はサイズを 3 cm×3 cm とし、オリーブ油を用いて 60℃30 分間の浸漬により調製した。

② 抽出条件の適用性の検討

シリコーンゴムで確立した抽出条件が天然ゴムにも適用できるか検討を行った。天然ゴ

ムの抽出試験用試料に内標準溶液 10 ml とシクロヘキサン 190 ml を加え、40℃の恒温振とう水槽で 120 分間振とう抽出した後、新たなシクロヘキサン 200 ml を用いて 40℃60 分間の振とう抽出を 3 回繰り返し、オリーブ油量を測定した (表 4)。

その結果、絶対検量線法では抽出 1 回目で 48.06 mg、2 回目で 0.55 mg 抽出されたが、3 及び 4 回目では定量限界未満となった。また、1 回目と 2 回目を合わせた抽出液では 49.15 mg、1~3 回目を合わせた抽出液では 50.60 mg であった。このことから、絶対量としてオリーブ油量を求めるならば、2 回以上の抽出が望ましいと考えられた。

一方、オリーブ油量を内標準法で定量したところ、抽出 1 回目、1 及び 2 回目を合わせた抽出液、1~3 回目を合わせた抽出液はいずれも 49.65~49.82 mg とよく一致していた。この値は絶対検量線法の抽出液 1~3 回のオリーブ油量 50.60 mg よりやや低いものの近似していた。すなわち、天然ゴムにおいても抽出 1 回目で試料に残存していたオリーブ油と内標準は平衡に達しており、内標準法を用いることにより、抽出は 1 回で十分であることが確認された。

以上のことから、天然ゴムにおける残存植物油の抽出は、これまでの材質と同様に、シクロヘキサンを用いて 40℃120 分間の振とう抽出 1 回のみとし、内標準法で定量することとした。

表 4 天然ゴムにおける抽出回数と得られたオリーブ油量

定量法	オリーブ油量 (mg)					
	抽出 1 回目	抽出 2 回目	抽出 3 回目	抽出 4 回目	抽出 1+2 回	抽出 1~3 回
絶対検量線法	48.06±0.64	0.55±0.24	ND	ND	49.15±0.44	50.60±0.18
内標準法	49.65±0.37	—	—	—	49.82±0.24	49.81±0.23

各 3 試行で試験を行い平均値±標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg

5) ポリ塩化ビニルにおける抽出条件の検討

① 抽出試験用試料の調製

ポリ塩化ビニルの抽出条件を検討するため、抽出試験用試料を調製した。

植物油溶出を行っていないポリ塩化ビニル試料について予試験を行ったところ、図8に示すようにオリブ油の定量用ピークであるオレイン酸メチルの保持時間に妨害ピークが検出され、ピーク面積はオリブ油約0.8 mgに相当した。一方、サフラワー油の定量用ピークであるリノール酸メチルの保持時間にも妨害ピークが見られたが、そのピークは小さく、サフラワー油約0.07 mg相当であった。そのため、サフラワー油を用いて抽出用試料を調製することとした。

サフラワー油を用いてポリエチレン等と同様に80°C60分間の溶出を行ったところ、サフラワー油含有量は0.5 mgで試料の収縮が見られた。試料が変形する条件での溶出は好ましくないことから、60°C30分間、40°C30分間、40°C1時間の溶出条件で溶出を試みたところ、サフラワー油含有量はそれぞれ4mg、10mg、11mgであり、80°C60分間より残存量は多かった。また、60°C30分間では若干収縮が認められたが、40°Cでは収縮は認められず、溶出時間による差もわずかであった。以上より、溶出条件は40°C30分間とした。

この条件における試料中のサフラワー油残存量は10 mgであるが、試料由来の妨害ピークは0.07 mg相当で0.7%に過ぎず、特に減算処理を行わなくても定量可能と判断された。

以上のことから、ポリ塩化ビニルの抽出試験用試料は、サフラワー油を用いて40°C30分間の浸漬により調製した。

② 抽出条件の適用性の検討

シリコーンゴムで確立した抽出条件及び定量法がポリ塩化ビニルでも適用できるか検討した。ポリ塩化ビニルの抽出試験用試料に内標準溶液10 mlとシクロヘキサン190 mlを加え、40°Cの恒温振とう水槽で120分間抽出した後、新たなシクロヘキサン200 mlを用いて40°C60分間の振とう抽出の操作を2回繰り返して、サフラワー油量を測定した(表5)。

その結果、絶対検量線法による抽出サフラワー油量は、抽出1回目で10.98 mgであったが2回目、3回目では定量限界未満であった。1回でほぼ全量抽出されているものの、抽出1回目と2回目を合わせた抽出液は1回目の抽出液より若干増加しており、絶対検量線法で測定するならば、抽出回数は2回以上が望ましいと考えられた。

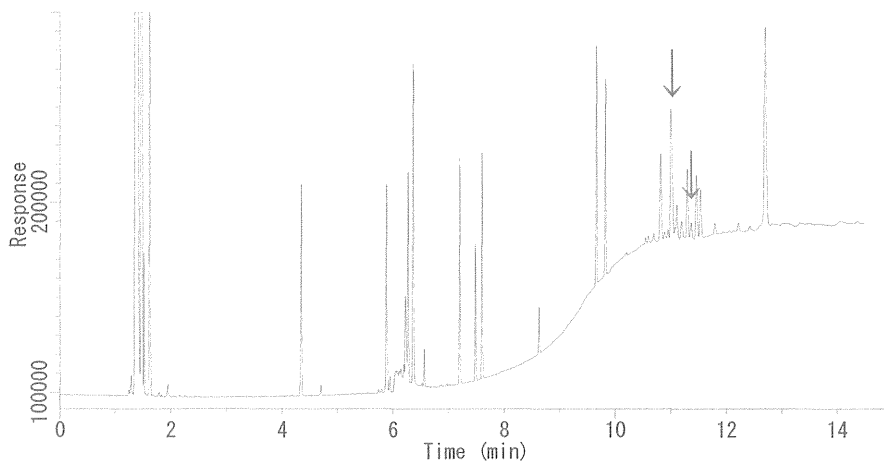
一方、内標準法では1回目の抽出液も1回目と2回目を合わせた抽出液もサフラワー油量は11.26及び11.29 mgとよく一致していた。すなわち、ポリ塩化ビニルにおいても抽出1回目で試料に残存していたサフラワー油と内標準は平衡に達しており、内標準法であれば、抽出は1回で十分であることが示された。

以上のことから、ポリ塩化ビニルにおける残存植物油の抽出も、シクロヘキサンを用いて40°C120分間の振とう抽出1回とし、内標準法で定量することとした。

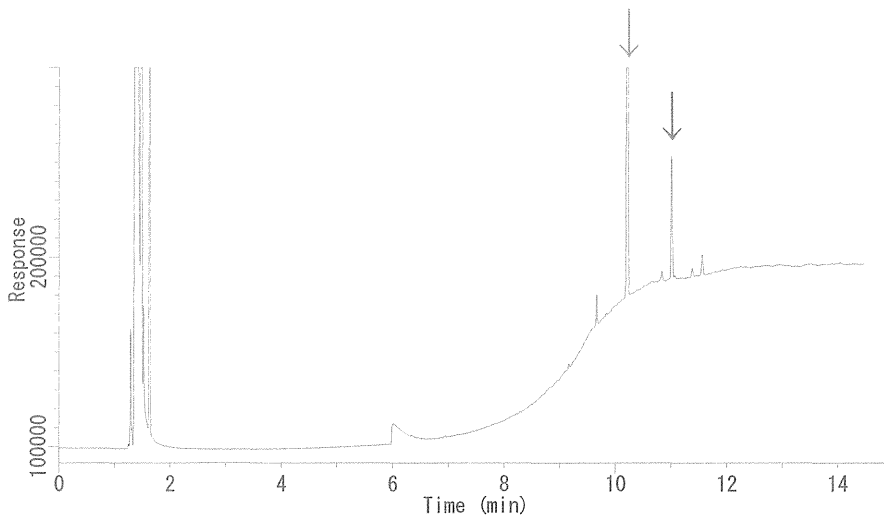
表5 ポリ塩化ビニルにおける抽出回数と得られたサフラワー油量

定量法	サフラワー油量 (mg)			
	抽出1回目	抽出2回目	抽出3回目	抽出1+2回
絶対検量線法	10.98±0.07	ND	ND	11.11±0.22
内標準法	11.26±0.12	—	—	11.29±0.15

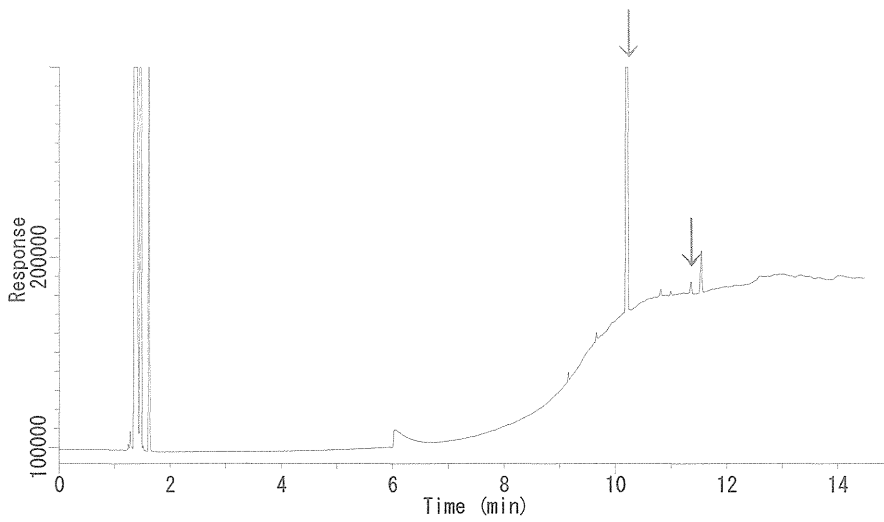
各3試行で試験を行い平均値±標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg



ポリ塩化ビニル (ブランク)



オリーブ油 (0.5mg)



サフラワー油 (0.05mg)

図8 ポリ塩化ビニルブランク、オリーブ油 (0.5 mg) 及びサフラワー油 (0.05 mg) のガスクロマトグラム
 保持時間：内標準 10.2 min、オレイン酸メチル 11.0 min、リノール酸メチル 11.3 min

3. 改良法と EN 法の同等性に関する検証

昨年度及び今年度実施した本研究の成果をもとに、B. 4. 1) に示す改良法を確立した。本法は EN 法と比較して、有害試薬を用いず、しかもはるかに簡便な試験法である。そこで、改良法と EN 法の同等性を検証するため、両法を用いてポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニル、シリコーンゴム及び天然ゴム製試料の植物油総溶出量を求め、試験結果を比較した(表6)。

植物油への溶出は、抽出試験用試料の調製と同様に以下の条件で行った。植物油として5試料はオリブ油を使用した。ポリ塩化ビニルは妨害ピークの影響を避けるためサフラワー油を使用した。植物油への溶出条件は、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンは80℃60分間、シリコーンゴム及び天然ゴムは60℃30分間、ポリ塩化ビニルは40℃30分間とした。また、試料サイズは10 cm×10 cm(表面積200cm²)としたが、天然ゴムは植物油残存量が高いと EN 法では測定できないことから3 cm×3 cm(表面積18 cm²)とした。また、各試験は3試行で行った。

試験結果はそれぞれ検体毎に計算を行い、溶出前後の質量差($W_b - W_a$ mg)、残存植物油量(W_c mg)、試料あたりの溶出物量($W_a - W_b + W_c$ mg)及び植物油総溶出物量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)について、それぞれの平均値及び標準偏差で記載した。なお、ポリプロピレン及びナイロンの植物油総溶出物量は定量限界(5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)未満であったが、両試験法の比較を行うために得られた数値を記載した。

大部分の試料では残存した植物油のため溶出前よりも溶出後の方が大きな質量となったが、ポリ塩化ビニルでは溶出前の質量の方が大きく質量差($W_b - W_a$ mg)はマイナスで表した。

いずれの材質においても、改良法と EN 法

で得られた試料あたりの溶出物量($W_a - W_b + W_c$ mg)及び植物油総溶出物量は極めてよく一致していた。また、いずれの標準偏差もほぼ同じレベルで十分に小さかった。

ポリプロピレン及びナイロンの植物油総溶出物量は定量限界(5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)未満であったため、平均値に対して標準偏差が大きくなったが、それでも両試験法による測定結果は十分に近似した数値と考えられる。

以上のように、改良法と EN 法により得られた植物油総溶出物量は極めて良く一致しており、しかも標準偏差も十分に低くほぼ同等であった。このことから改良法は EN 法と同等の試験結果を得ることができ、その試験精度もほぼ同等であることが検証された。

D. 結論

合成樹脂及びゴム製器具・容器包装のうち、油脂及び脂肪性食品と接触して使用される製品の総量試験である植物油総溶出物量試験法について改良を行った。

この試験法のもととなったオリブ油総溶出物量試験法は、欧州連合の合成樹脂製器具及び容器包装の規格として採用されており、試験法は欧州標準規格 EN 1186-2 に記載されている。しかし、試験法は極めて煩雑で長時間を要し有害試薬を使用するなど問題が多い。

そこで、昨年度は試料の恒量化と植物油のメチルエステル化について改良を行った。今年度はガスクロマトグラフィーによる植物油のメチルエステル体測定時の定量限界及び検量線について改めて検討を行うとともに、試料中の残存植物油の抽出法について検討を行った。その結果、内標準を加えたシクロヘキサンに浸漬し、40℃で120分間の振とう抽出1回のみという簡便な抽出法で、試料に残存する植物油量を正しく求められることが判明した。これらの検討結果をもとに、操作が簡

表6 改良法とEN法による植物油総溶出物量の比較

材質	試料表面積 (cm ²)	植物油	溶出条件	試験法	W _b -W _a (mg)	W _c (mg)	W _a -W _b +W _c (mg)	植物油総溶出物量 (µg/cm ²)
ポリエチレン	200	オリーブ油	80°C60分	改良法	6.3±0.3	16.3±0.5	10.1±0.2	50.3±0.9
				EN法	5.9±0.4	16.5±0.3	10.5±0.1	52.7±0.7
ポリプロピレン	200	オリーブ油	80°C60分	改良法	11.0±0.1	11.1±0.3	0.1±0.3	0.3±1.3
				EN法	11.0±0.2	11.2±0.1	0.2±0.1	1.1±0.5
ナイロン	200	オリーブ油	80°C60分	改良法	0.3±0.2	ND	0.3±0.2	1.5±1.1
				EN法	0.3±0.2	0.1±0.1	0.4±0.3	2.0±1.4
ポリ塩化ビニル	200	サフラワー油	40°C30分	改良法	-8.3±0.5	11.3±0.1	19.5±0.4	97.6±2.0
				EN法	-8.2±0.5	10.6±0.1	18.8±0.4	94.2±1.9
シリコーンゴム	200	オリーブ油	60°C30分	改良法	29.5±0.7	57.9±0.3	28.5±0.4	142.4±1.8
				EN法	31.2±0.4	59.6±0.7	28.4±0.9	142.1±4.5
天然ゴム	18	オリーブ油	60°C30分	改良法	27.6±0.6	49.6±0.4	22.0±0.8	1,223 ±44
				EN法	27.7±0.6	49.9±0.7	22.2±0.5	1,235 ±28

各3試行で試験及び計算を行い、項目毎に平均値±標準偏差で記載した。

ND < 0.05 mg、それ以降の計算ではNDは0 mgとした。

便でしかも有害試薬を使用しない植物油総溶出物量試験法の改良法を確立した。

本試験法と EN 法の同等性を検証するため、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニル、シリコーンゴム及び天然ゴムの 6 種類の試料を用いて、両試験法により植物油総溶出物量試験を行い、試験結果を比較検討した。その結果、両試験法により得られた植物油総溶出物量及びその標準偏差は極めて良く一致しており、両者は同等の試験法であると結論された。

今回確立した改良法は、EN 法と同等の試験精度を持ちながら、その操作は大幅に簡便化され、しかも有害試薬を用いない優れた試験法である。そのため、今後、多くの試験機関で実施されることを期待する。そこで、来年度はいくつかの試験機関の協力を得て、改良法の共同試験を実施し、その操作性と妥当性を評価する予定である。

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) 文部科学省：五訂増補日本食品標準成分表脂肪酸成分表編第 2 章第 1 表(2005). (http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031801/003.htm)
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2010, p.216-7, 金原出版 (2010).
- 4) 河村ら：HPLC によるポリエチレン中の酸化防止剤及び紫外線吸収剤の一斉分析法, 食衛誌, 37, 272-280 (1996).
- 5) 河村ら：ポリ塩化ビニル製品中の添加剤の一斉分析法, 食衛誌, 40, 189-197 (1999).
- 6) 河村ら：食品用ポリプロピレン製品中の添加剤の分析, 食衛誌, 41, 54-161 (2000).
- 7) 河村ら：食品用シリコーンゴム製品中の残存化学物質, 食衛誌, 42, 316-321 (2001).

＜その2＞ガスクロマトグラフィーを用いる試験法における キャリアーガスの変更による影響

研究協力者 羽石 奈穂子 東京都健康安全研究センター

A. 研究目的

ヘリウム (He) は天然ガスの副産物として生成されるガスで GC のキャリアーガスとして汎用されている。2012 年以前は大部分を米国から輸入していたが、2012 年に米国の製造プラントのメンテナンス等の影響により、He の供給不足が問題視されるようになった。2013 年になって輸入先の変更などにより He の供給不足は一時解消されたものの、価格は上昇した。また、今後同様の供給不足が起こることも危惧されている。

食品衛生法では、ポリスチレンの揮発性物質、ポリ塩化ビニルの塩化ビニルおよびポリ塩化ビニリデンの塩化ビニリデン材質試験、ポリメタクリル酸メチルのメタクリル酸メチル、ナイロンのカプロラクタムおよび金属缶からのエピクロルヒドリンの溶出試験では、水素炎イオン化検出器を用いたガスクロマトグラフィー (GC-FID) が規定されている。

いずれの試験においても GC-FID のキャリアーガスは、窒素 (N_2) または He と規定されているが、 N_2 は He と比べて安価であるが、最適線速度が小さいうえ、最適流速域が狭く、最適な条件となるような流量の調整が He よりもやや難しい。そのため大部分の機関ではキャリアーガスに He を使用している。

一方、食品衛生法のポリカーボネート中のアミン類材質試験については窒素・リン検出器 (NPD) または熱イオン化検出器 (FTD) を用いた GC が規定されており、キャリアーガスは He のみが規定されている。しかし、これらの検出器の構造および原理は FID と類似したものであるため、キャリアーガスとし

て N_2 を適用することが可能である。

近年の He の供給不安定化と価格の上昇により、GC メーカーでは He の代替として、安価で安定した供給が可能な N_2 または水素 (H_2) の使用を推奨している。しかし、 H_2 は引火等により爆発しやすいことから、安全性を確保するための配慮や設備が必要である。そのため、GC による試験において He から N_2 へのキャリアーガスの切替を検討している試験機関も少なくない。 N_2 を使用した GC はかつて広く使用されていたが、近年は実績が乏しく、その性能について He と N_2 を比較した評価はほとんど行われていない。

そこで、GC-FID および GC-NPD を使用する試験法について、同一装置、同一条件を用いキャリアーガスのみを He と N_2 に換えて測定を行い、試験対象物質の保持時間、感度等のクロマトグラムの変化、検量線の範囲および直線性を比較するとともに、それぞれの試験法としての真度および精度を求め、性能を評価した。

B. 実験方法

1. 装置

GC-FID、GC-NPD : HP7890、ヘッドスペースサンプラー : HSS 7697A 以上 Agilent Technologies 社製

2. 各試験法における試験溶液の調製 および測定条件

1) 揮発性物質試験

①試料

市販のポリスチレン製コップ

②試薬・試液等

揮発性物質混合標準液（5種）：スチレン、トルエン、エチルベンゼン、イソプロピルベンゼンおよびプロピルベンゼン各 1000 mg/L テトラヒドロフラン溶液、1,4-ジエチルベンゼン標準液：1000 mg/L テトラヒドロフラン溶液、以上、関東化学（株）製

テトラヒドロフラン：特級、和光純薬工業（株）製

③検量線溶液

テトラヒドロフラン約 1 mL に揮発性物質混合標準液 50、100、150、200、250 μ L を加えたのち、各々に 1,4-ジエチルベンゼン標準液 100 μ L を加え、テトラヒドロフランで 2 mL とした（揮発性物質各 25、50、75、100、125 μ g/mL、1,4-ジエチルベンゼン 50 μ g/mL）。

今回は、標準溶液及び試験溶液の調製に市販の揮発性物質混合標準液（5種）（各 1000 mg/L）および 1,4-ジエチルベンゼン標準液（1000 mg/L）を使用したため、これらの調製法や 1,4-ジエチルベンゼン（内標準）の濃度が食品衛生法とは異なる。しかし、今年度の「規格試験法の性能評価に関する研究 <その 1>ポリスチレン製器具・容器包装における揮発性物質試験の性能評価」において、これらの違いは本試験法の性能に対してほとんど影響がないことが判明している。

④ブランク溶液および添加溶液

試料を細切し、その 0.5 g を量り、20 mL のメスフラスコに採り、テトラヒドロフランを適量加えた。試料が溶けた後、1,4-ジエチルベンゼン標準液 1 mL を加え、次にテトラヒドロフランを加え 20 mL とした。これをブランク溶液として GC-FID で測定した。また、試料 0.5 g を適量のテトラヒドロフランで溶解し、揮発性物質混合標準液および 1,4-ジエチルベンゼン標準液をそれぞれ 1 mL 加え、テトラヒドロフランで 20 mL とし

たものを添加溶液（各 50 μ g/mL）とした。

⑤測定条件

カラム：DB-WAX (0.25 mm \times 30 m、膜厚 0.5 μ m)、カラム温度：60 $^{\circ}$ C (0 min) - 4 $^{\circ}$ C/min - 100 $^{\circ}$ C(0 min) -10 $^{\circ}$ C/min-150 $^{\circ}$ C、注入量：1 μ L（スプリット比 1:30）、注入口温度：220 $^{\circ}$ C、検出器温度：220 $^{\circ}$ C、キャリアーガス：He または N₂、1.6 mL/min、検出器：FID

2) 塩化ビニル試験

①試料

市販のポリ塩化ビニル製ラップフィルム

②試薬・試液等

塩化ビニル標準液：10 mg/L エタノール溶液、関東化学（株）製

N,N-ジメチルアセトアミド：特級、和光純薬工業（株）製

③検量線溶液

N,N-ジメチルアセトアミド 2.5 mL に塩化ビニル標準液 10、25、50、100、250 μ L を加えた（材質濃度 0.2、0.5、1、2、5 μ g/g 相当）。

④ブランク溶液および添加溶液

試料を細切し、その 0.5 g を量り、20 mL のセプタムキャップ付きのガラス瓶に入れた。次いで、*N,N*-ジメチルアセトアミド 2.5 mL を加えただけに密封した。これをブランク溶液とし、ヘッドスペースサンプラーを用いて GC-FID で測定した。さらに、ブランク溶液 2.5 mL に塩化ビニル標準溶液 50 μ L を添加したものを添加溶液（試料あたり 1 μ g/g）とした。

⑤測定条件

GC 条件 カラム：CP-PorabondQ (0.25 mm \times 25 m、膜厚 3 μ m)、カラム温度：80 $^{\circ}$ C (1min) - 10 $^{\circ}$ C/min - 250 $^{\circ}$ C (10 min)、注入量：0.5 mL（スプリット比 1:10）、注入口温度：200 $^{\circ}$ C、検出器温度：250 $^{\circ}$ C、キャリアーガス：He または N₂、2.0 mL/min、検出器：FID

ヘッドスペース条件 オープン温度：90 $^{\circ}$ C、

ループ温度：100℃、トランスファーライン：110℃、バイアル平衡化時間：60分、注入時間：0.5分

3) 塩化ビニリデン試験

①試料

市販のポリ塩化ビニリデン製ラップフィルム

②試薬・試液等

塩化ビニリデン：1,1-ジクロロエチレン（シリンダー入り）、東京化成工業（株）製

N,N-ジメチルアセトアミド：特級、和光純薬工業（株）製

③検量線溶液

塩化ビニリデン 25 μL に *N,N*-ジメチルアセトアミドを加え 10 mL とし、これを 0.1 mL とり 5 mL としたものを標準原液（60 μg/mL）とした。*N,N*-ジメチルアセトアミド 2.5 mL に塩化ビニリデン標準原液 5、10、25、50、100、200 μL を加えた（材質濃度 0.6、1.2、3、6、12、24 μg/g 相当）。

④ブランク溶液および添加溶液

試料を細切し、その 0.5 g を量り、20 mL のセプトムキャップ付きのガラス瓶に入れた。次いで、*N,N*-ジメチルアセトアミド 2.5 mL を加えた。これをブランク溶液とし、ヘッドスペースサンプラーを用いて GC-FID で測定した。さらに、ブランク溶液 2.5 mL に塩化ビニリデン標準溶液 50 μL を添加したものを添加溶液（試料あたり 6 μg/g）とした。

⑤測定条件

塩化ビニルと同様の条件を用いた。

4) メタクリル酸メチル試験

①試料

市販のポリメタクリル酸メチル製調味料入れ

②試液・試薬等

メタクリル酸メチル、エタノール：以上、特級、和光純薬工業（株）製

③検量線溶液

メタクリル酸メチル 100 mg に 20%エタノールを加えて溶かし 100 mL としたものを標準原液（1000 μg/mL）とした。これを 20%エタノールで希釈して 2、5、10、15、20 μg/mL とした。

④ブランク溶液および添加溶液

試料の表面積 1 cm² につき 2 mL の割合の 20%エタノールを 60℃に加温して試料に加え、60℃に保ちながら 30 分間放置した。この溶出液をブランク溶液として GC-FID で測定した。さらに、ブランク溶液 10 mL にメタクリル酸メチル標準原液 150 μL を添加したものを添加溶液（15 μg/mL）とした。

⑤測定条件

カラム：DB-1 (0.32 mm×30 m、膜厚 5 μm)、カラム温度：120℃ (1 min) - 5℃/min - 170℃、注入量：1 μL（スプリット比 1:10）、注入口温度：200℃、検出器温度：200℃、キャリアガス：He または N₂、1.55 mL/min、検出器：FID

5) カプロラクタム試験

①試料

市販のナイロン製杓子

②試薬・試液等

カプロラクタム、エタノール：以上、特級、和光純薬工業（株）製

③検量線溶液

カプロラクタム 100 mg に 20%エタノールを加えて溶かし 100 mL としたものを標準原液（1000 μg/mL）とした。これを 20%エタノールで希釈して 5、10、15、20、25、30 μg/mL とした。

④ブランク溶液および添加溶液

試料の表面積 1 cm² につき 2 mL の割合の 20%エタノールを 60℃に加温して試料に加え、60℃に保ちながら 30 分間放置した。この溶出液をブランク溶液として GC-FID で測

定した。さらに、ブランク溶液 10 mL にカプロラクタム標準原液 150 μ L を添加したものを添加溶液 (15 μ g/mL) とした。

⑤測定条件

カラム : DB-1 (0.32 mm \times 30 m、膜厚 5 μ m)、カラム温度 : 240 $^{\circ}$ C、注入量 : 1 μ L (スプリット比 1:10)、注入口温度 : 240 $^{\circ}$ C、検出器温度 : 240 $^{\circ}$ C、キャリアーガス : He または N₂、1.4 mL/min、検出器 : FID

6) エピクロルヒドリン試験

①試料

未使用のエポキシ樹脂塗装金属缶

②試薬・試液等

エピクロルヒドリン、ペンタン : 以上、特級、和光純薬工業 (株) 製

③検量線溶液

エピクロルヒドリン 100 mg にペンタンを加え 100 mL としたものを標準原液 (1000 μ g/mL) とした。これをペンタンで希釈し、0.25、0.5、1、2.5、5 μ g/mL とした。

④ブランク溶液および添加溶液

試料にペンタンを満たし、25 $^{\circ}$ C で一時間放置した。この溶出液を試験ブランクとして GC-FID で測定した。さらに、ブランク溶液 10 mL にエピクロルヒドリン標準原液 5 μ L を添加したものを添加溶液 (0.5 μ g/mL) とした。

⑤測定条件

カラム : DB-WAX (0.53 mm \times 30 m、膜厚 1 μ m)、カラム温度 : 50 $^{\circ}$ C (5min) - 10 $^{\circ}$ C/min - 100 $^{\circ}$ C、注入量 : 5 μ L (スプリット比 1:10)、注入口温度 : 220 $^{\circ}$ C、検出器温度 : 220 $^{\circ}$ C、キャリアーガス : He または N₂、15 mL/min、検出器 : FID

7) アミン類試験

①試料

市販のポリカーボネート製計量カップ

②試薬・試液等

トリエチルアミン、トリブチルアミン、アセトン、ジクロロメタン : 以上、特級、和光純薬工業 (株) 製

③検量線溶液

トリエチルアミンおよびトリブチルアミン 100 mg それぞれにジクロロメタンを加え 100 mL としたものを各標準原液 (1000 μ g/mL) とした。それらを等量混合し、ジクロロメタンで希釈して 0.2、0.4、0.6、0.8、1 μ g/mL とした。

④ブランク溶液および添加溶液

試料を細切し、その 1.0 g を 200 mL の三角フラスコに入れ、ジクロロメタン 20 mL を加えた。試料が溶けた後、よくかき混ぜながらアセトン 100 mL を滴加し、毎分 3,000 回転で約 10 分間遠心分離を行なった。上澄液を減圧濃縮器を用いて約 1 mL に濃縮した後、ジクロロメタンを加えて 2 mL とした。これをブランク溶液として GC-FID で測定した。さらに、ブランク溶液 2 mL にトリエチルアミンおよびトリブチルアミン標準溶液 (10 μ g/mL) を 100 μ L 添加したものを添加溶液 (各 0.5 μ g/mL) とした。

⑤測定条件

カラム : DB-1 (0.32 mm \times 30 m、膜厚 5 μ m)、カラム温度 : 150 $^{\circ}$ C (5 min) - 20/min - 250 $^{\circ}$ C (5 min)、注入量 : 1 μ L (スプリット比 1:15)、注入口温度 : 200 $^{\circ}$ C、検出器温度 : 250 $^{\circ}$ C、キャリアーガス : He または N₂、1.2 mL/min、検出器 : Bloss NPD

4. 性能評価

1) クロマトグラム

各測定条件において、キャリアーガスとして He を用いた場合を He 法、N₂ を用いた場合を N₂ 法とした。キャリアーガス流量は He 法で調整し、N₂ 法はキャリアーガスのみを N₂

に変更した。

揮発性物質試験においては 50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の検量線溶液、アミン類試験においては 1 $\mu\text{g/mL}$ の検量線溶液から調製した標準溶液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)、その他の試験においては規格値の濃度に相当する検量線溶液を He 法および N_2 法で測定し、得られたクロマトグラムから試験対象物質の保持時間、ピーク形状、ピーク面積 (揮発性物質試験においてはピーク面積比) を求めて比較した。

さらに、ブランク溶液を He 法および N_2 法で測定し、選択性を比較した。選択性は試験対象物質に対する妨害ピークの有無により判断した。

2) 検量線

検量線溶液を He 法および N_2 法の両法で測定し、試験対象物質のピーク面積 (揮発性物質試験においてはピーク面積比) から検量線を作成した。それぞれの定量可能範囲および検量線の濃度、直線性および近似式を比較した。

3) 真度および精度

同一の添加溶液を He 法および N_2 法によりそれぞれ 1 日 2 試行で 5 日間測定し、真度、併行精度 (RSD_r) および室内再現精度 (RSD_i) を比較した。真度、 RSD_r および RSD_i は、添加溶液中の試験対象物質の濃度を定量し、「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」¹⁾ に従って、一元配置の分散分析により求めた。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%、 RSD_r は 10%以下、 RSD_i は 15%以下とした。

C. 結果と考察

1. 揮発性物質試験の性能評価

1) クロマトグラム

揮発性物質標準溶液 (各 50 $\mu\text{g/mL}$) およびブランク溶液を He 法および N_2 法で測定し、

各成分の保持時間、ピーク形状、面積比を比較するとともに選択性を確認した。両法のガスクロマトグラムを図 1 に示した。

He 法に比べ N_2 法では、すべてのピークがややテーリングしていたが、各成分のピークの分離に問題はなく、保持時間およびピーク面積比はほぼ同じであった。

揮発性物質試験では、すべての成分が検出されない試料を入手することができなかったため、スチレンを含有する試料を用いてブランク試料を調製し、選択性を確認した。He 法、 N_2 法ともにブランク溶液ではスチレン以外のピークは認められず、すべての成分において、試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図 2 に示した。He 法に比べ N_2 法では、検量線の傾きがやや大きくなったが、いずれの検量線も 25 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性 ($\text{R}^2 = 0.9992 \sim 0.9999$) を示した。また、各成分とも 25 $\mu\text{g/mL}$ まで定量可能であった。

3) 真度および精度

He 法および N_2 法により添加溶液を 1 日 2 試行で 5 日間測定した時のそれぞれの定量値および解析結果を表 1 に示した。ただし、スチレンの定量値は添加溶液からブランク溶液の定量値を差し引いて求めた。

He 法、 N_2 法ともに、いずれの成分においても真度は 100.6~103.5%と良好であった。併行精度は 0.1~0.6%といずれも小さくキャリアーガスによる差はみられなかった。一方、トルエン、エチルベンゼン、およびスチレンの室内再現精度は He 法よりも N_2 法でやや大きかった。しかし、目標値は十分に満たしており、規格試験法として十分な性能を有していた。

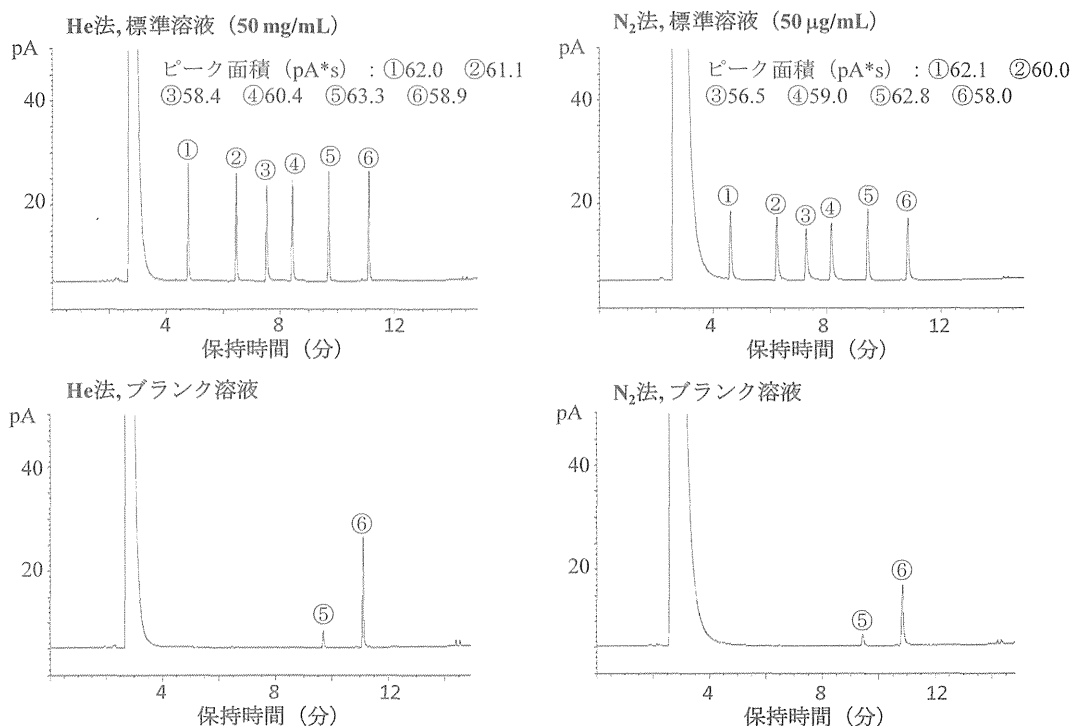


図1 揮発性物質試験のGC-FIDクロマトグラム
①トルエン、②エチルベンゼン、③イソプロピルベンゼン
④プロピルベンゼン、⑤スチレン、⑥1,4-ジエチルベンゼン

表1 揮発性物質試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

物質	試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD _r (%)	RSD _i (%)
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
TO	He法	50.7	50.7	50.8	50.6	50.8	101.6	0.3	0.3
		50.9	50.8	50.9	51.0	51.1			
	N ₂ 法	50.7	50.5	52.8	50.6	50.8	102.0	0.3	2.1
		50.5	50.4	53.0	50.4	50.6			
EB	He法	50.7	50.8	50.9	51.0	51.0	101.9	0.2	0.3
		51.0	50.8	50.9	51.0	51.2			
	N ₂ 法	53.1	52.0	51.9	50.9	51.1	103.5	0.2	1.7
		53.0	51.9	51.9	50.7	51.0			
iPB	He法	50.3	50.6	50.2	50.3	50.5	100.6	0.2	0.5
		50.4	50.6	49.9	50.1	50.4			
	N ₂ 法	50.5	50.5	50.9	50.6	51.1	101.3	0.6	0.6
		50.9	50.5	50.0	50.7	50.9			
PB	He法	50.6	50.6	50.5	50.4	50.8	101.1	0.1	0.2
		50.4	50.6	50.5	50.5	50.6			
	N ₂ 法	50.6	51.1	51.1	50.5	50.9	101.5	0.3	0.5
		50.7	50.9	50.8	50.4	50.7			
ST	He法	50.4	50.5	50.9	50.8	50.9	101.6	0.3	0.5
		50.7	50.4	51.0	51.2	51.0			
	N ₂ 法	50.7	50.5	52.8	50.6	50.8	102.0	0.3	2.1
		50.5	50.4	53.0	50.4	50.6			

TO: トルエン、EB: エチルベンゼン、iPB: イソプロピルベンゼン、
PB: プロピルベンゼン、ST: スチレン、
RSD_r: 併行精度、RSD_i: 室内再現精度

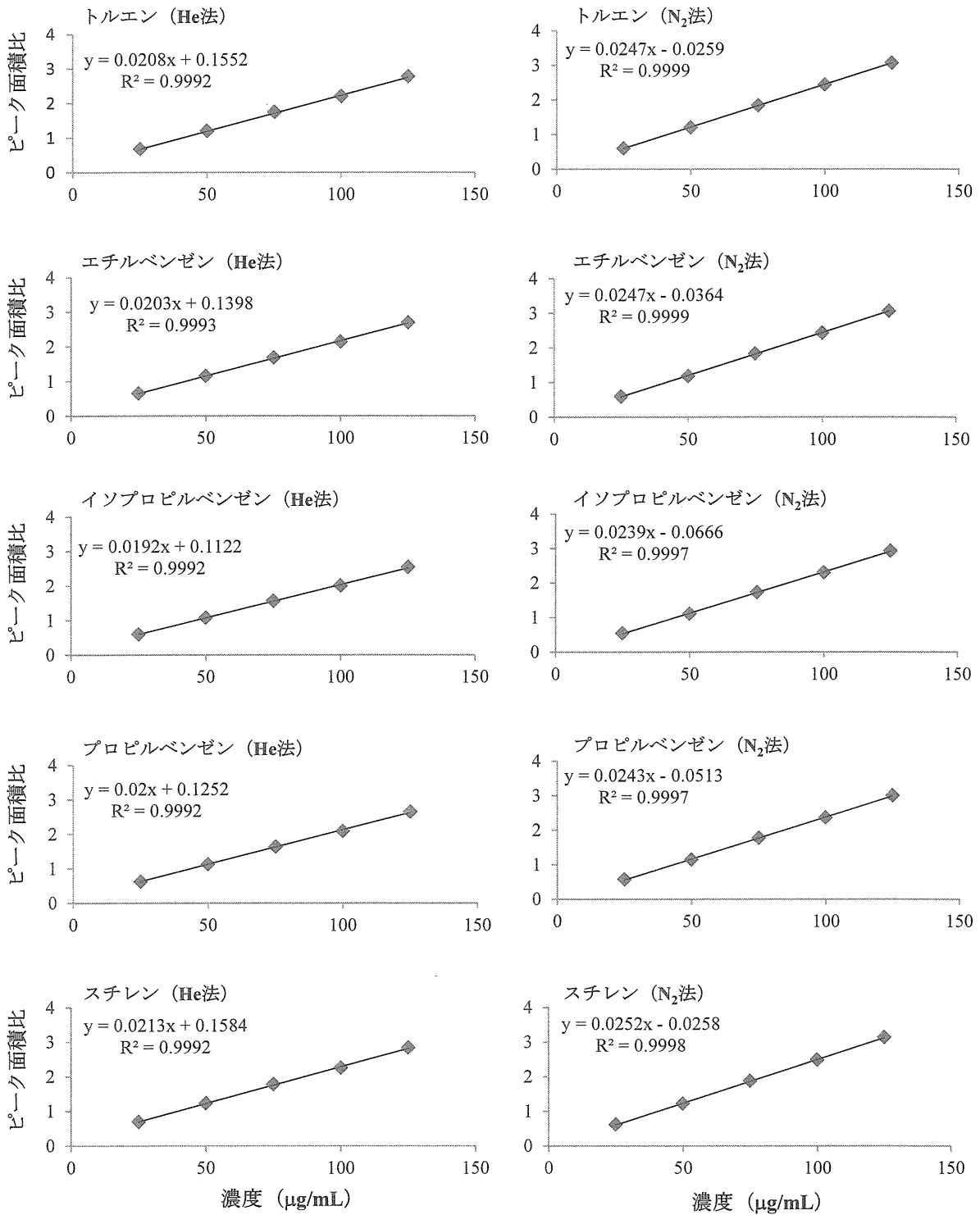


図2 揮発性物質試験における各成分の検量線

2. 塩化ビニル試験の性能評価

1) クロマトグラム

塩化ビニル標準溶液 (1 µg/g 相当) およびブランク溶液を He 法および N₂ 法で測定した。それらのクロマトグラムを図3に示した。両

法ともに、ピーク形状およびピークの分離も良好で、保持時間およびピーク面積に大きな違いはなかった。また、ブランク溶液では、いずれのキャリアガスにおいても試験の支障となるような妨害ピークは存在しなかった。

2) 検量線

各法を用いて作成した検量線を図4に示した。両法ともに、検量線は、0.2~5 µg/g（標準原液添加量 10~250 µL）の範囲で良好な直線性（ $R^2 = 0.999$ および 0.9998 ）を示した。また、両法とも規格値（1 µg/g）の 1/5 の濃度である 0.2 µg/g まで定量可能であった。

3) 真度および精度

1日2試行で5日間測定した時の定量値および解析結果を表2に示した。He法およびN₂法の真度はそれぞれ94.9および96.7%と良好であった。また、 RSD_r は5.6および3.9%、 RSD_i は6.8および5.2%であり、キャリアガスによる差はなく、いずれも目標値を満たしていた。

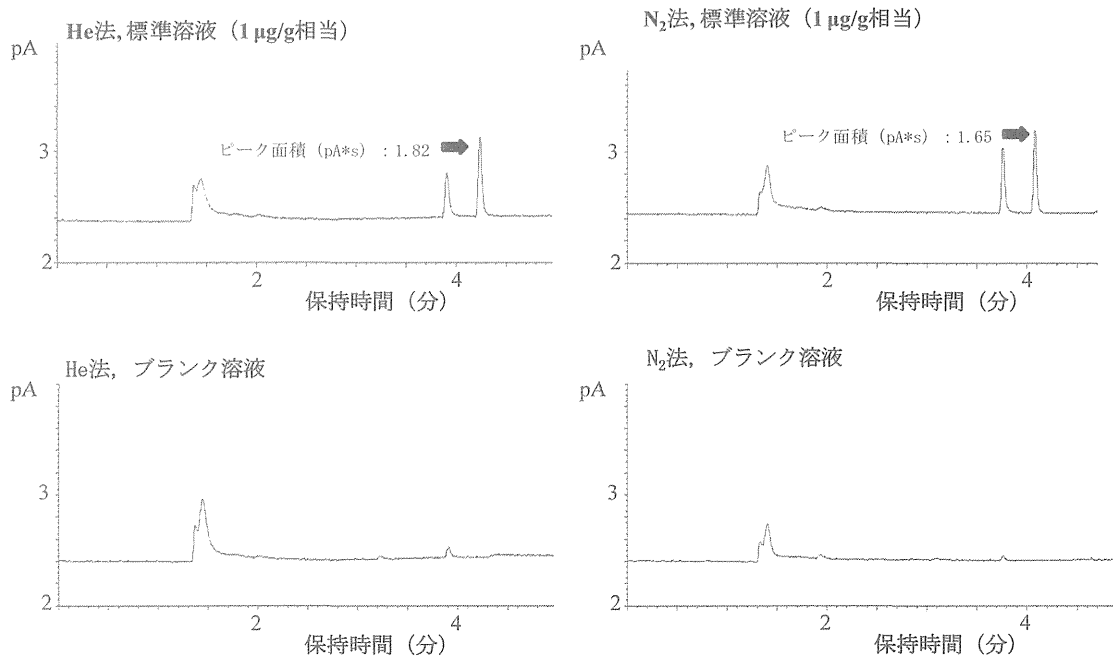


図3 塩化ビニルのGC-FIDクロマトグラム

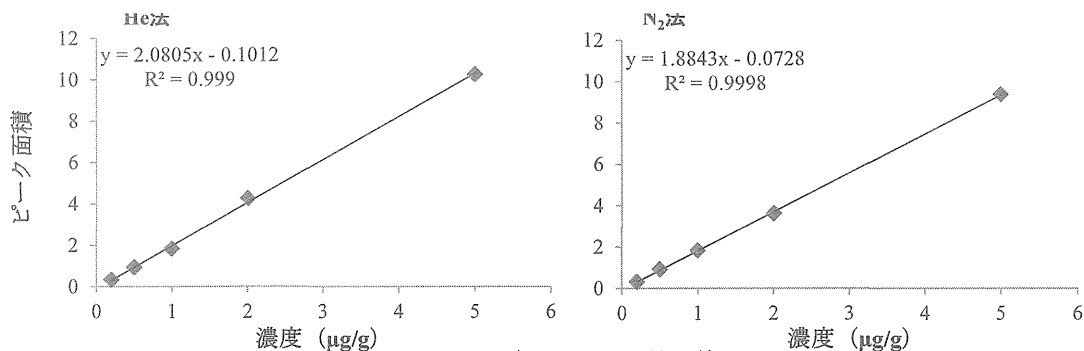


図4 塩化ビニルの検量線

表2 塩化ビニル試験のGC-FID測定における各成分の真度および精度

試験法	定量値 (µg/mL)					真度 (%)	RSD_r (%)	RSD_i (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
He法	0.86	0.94	1.05	1.02	0.96	94.9	5.6	6.8
	0.86	1.00	0.91	0.94	0.96			
N ₂ 法	1.00	1.00	1.06	0.90	0.94	96.7	3.9	5.2
	0.96	1.01	0.94	0.90	0.95			

RSD_r : 併行精度、 RSD_i : 室内再現精度