

<その1> 植物油総溶出物量試験法の改良 植物油抽出法の検討及び改良試験法の検証

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、渡邊 雄一、城市 香、川口 寿之

(一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

オリブ油総溶出物量試験 (Overall Migration Test into Olive Oil) は、器具・容器包装などの食品接触物質からの溶出物の総量を測定する試験 (Overall Migration Test、我が国の蒸発残留物試験にほぼ相当) の一つであり、油脂及び脂肪性食品に使用される食品接触物質に適用される。欧州連合では規格試験として採用され、その試験法は欧州標準規格 EN 1186-2 (EN 法)¹⁾ に収載されている。

オリブ油総溶出物量試験は合成樹脂やゴム製器具・容器包装の油脂及び脂肪性食品への溶出傾向を明らかにし、またそれらに対応する蒸発残留物試験の代替溶媒や試験条件を設定するために必須である。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、油脂及び脂肪性食品用の合成樹脂及びゴム製器具・容器包装の蒸発残留物試験の見直しを行い、EN 法を用いてオリブ油総溶出物量を求め、それをもとに適切な代替溶媒及び試験条件の設定を行った。

しかし、EN 法は操作が極めて煩雑で長時間を要し、試験には熟練した技術が求められる。しかも、有害試薬である三フッ化ホウ素メタノールを使用する。そのため、我が国では実施できる試験機関が限られている。

そこで本研究では、EN 法をもとに、より

精度が高く、安全で、しかも簡便な試験法に改良し、多くの試験機関で実施できる試験法として確立することを目的とした。一方、試験にはオリブ油以外の植物油も使用することから、試験法の名称を植物油総溶出物量試験法に変更し、オリブ油以外の植物油も使用可能であることを明確にした。

昨年度の本研究では、植物油総溶出物量試験法のうち試料の恒量化及び試料中に残存する植物油の定量法について検討を行った。試料の恒量化では、43%硫酸デシケーター(温度 20、相対湿度 50%)を用いて試料を安定化することにより、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、シリコーンゴム、天然ゴムのいずれの試料でも、短期間で恒量化することができた。また、試料中に残存する植物油の定量法では、ガスクロマトグラフィーの測定条件を検討するとともに、メチルエステル化法として、還流下での煩雑な操作や有害試薬を用いる三フッ化ホウ素メタノール法からナトリウムメトキシド法への変更を検討し、有害試薬を用いずしかも室温下での簡便な試験法を確立した。

今年度は、ガスクロマトグラフィーによる植物油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さらに検討を行った。さらに、溶出操作後の試料中に残存する植物油の抽出法について検討を行い、簡便な抽出条件を見出した。これにより改良法の全操作を確立した。そこで、今回確立した改良法と EN 法を用いて各種試料の植物油総溶出物量を求

め、これらの同等性について検証した。これらの研究成果について報告する。

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）、ナイロンシート（厚さ 0.3 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）の 6 試料

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

43%硫酸：水 547 g に 95%硫酸 453 g を少量ずつ混和して調製した。

オリーブ油：和光純薬工業(株)製

サフラワー油：リノール酸 71%、オレイン酸 16%、Sigma-Aldrich 社製

シクロヘキサン、ヘプタン、酢酸：特級、関東化学(株)製

ヘキサン、エタノール(99.5)、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

ペンタン：鹿特級、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

トリヘプタデカノイン：純度 99%以上、Sigma-Aldrich 社製

内標準溶液：トリヘプタデカノイン 200 mg に抽出溶媒と同じ溶媒を加えて溶解し、100 ml に定容した（濃度 2 mg/ml）

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

水酸化カリウムメタノール溶液：水酸化カ

リウム 11 g をメタノールに溶解して 1000 ml に定容した（濃度 11 g/L）

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上清を用いた。

3. 器具及び装置

硫酸デシケーター：43%硫酸を入れ 20 ± 1 °C で平衡状態にしたデシケーター（相対湿度 50 ± 2%）

電子天秤：XS204 または XSE204（いずれも最小表示 0.1 mg）以上メトラー・トレド(株)製

恒温振とう水槽：T-N22S、トーマス科学器械(株)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. 植物油総溶出物量試験法

1) 改良法

予試験

試料（10 cm × 10 cm または所定のサイズ）を用いてあらかじめ以下の ~ の操作を行い、ガスクロマトグラム上に植物油の定量を妨げるピークが存在しないことを確認した。植物油としてオリーブ油を使用し、その定量用ピークにはオレイン酸メチルを用いた。ただし、試料由来の妨害ピークにより定量できない場合には、植物油としてサフラワー油を用い、定量用ピークにはリノール酸メチルを用いた。

溶出前の試料恒量の測定

試料（10 cm × 10 cm、表面積 200 cm²）は質量を測定し、硫酸デシケーターに静置した。24 時間以上間隔をあけて試料を取り出し、質量を測定して前回測定した質量との質量差を求めた。質量差が 0.5 mg 以下になるまでこの

操作を繰り返し、最後に得られた質量を溶出前の試料恒量 (W_a mg) とした。ただし、天然ゴムの抽出法の検討及び検証では $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ の試料 (表面積 18 cm^2) を使用した。

植物油への溶出

試料の表面積 1 cm^2 あたり 2 ml の植物油を所定温度に加熱して試料を浸漬し、所定温度に保ちながら所定時間静置したのち試料を取り出した。今回の試験法の検証では、植物油としてオリーブ油 (ポリ塩化ビニルはサフラワー油) を用いた。その後、試料に付着した植物油をろ紙、キムワイプなどで除去し、さらに試料をろ紙などに挟んで約 10 kg の重しをのせ数時間静置する操作を、ろ紙などに植物油が付着しなくなるまで繰り返した。

なお、今回の検討では、溶出条件として、シリコンゴム及び天然ゴムは $60\text{ } 30$ 分間、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンは $80\text{ } 60$ 分間、ポリ塩化ビニルは $40\text{ } 30$ 分間を用いた。

溶出後の試料恒量の測定

植物油を十分に除去した試料は、質量を測定し硫酸デシケーターに静置した。溶出前の試料恒量の測定と同様に操作し、最後に得られた質量を溶出後の試料恒量 (W_b mg) とした。

試料中の残存植物油の抽出

試料を広口びんに入れ、シクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加えて密栓した。 $40\text{ } 0$ の恒温振とう水槽で振とうしながら 120 分間抽出した。抽出液をナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮し窒素気流下で乾固した。

植物油のメチルエステル化

残渣にヘプタン 10 ml を加えて溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 0.5 ml 及びメタノール 2 ml を加え、室温で 15 分間緩やかに振とうした。これに水 5 ml 及び酢酸 0.5 ml を加え

て振とうしたのち静置した。

植物油の定量

ヘプタン層を GC-FID に注入し、得られたガスクロマトグラムから植物油の定量用ピークと内標準ピークの面積を求め、内標準法により試料中に残存する植物油量 (W_c mg) を求めた。検量線は植物油 ($0\text{ } 1500\text{ mg}$) に内標準溶液 10 ml を加えて及びの操作を行って作成した。

GC-FID 測定条件

カラム : Polyethylene glycol 系 (0.25 mm i.d. $\times 30\text{ m}$, 膜厚 $0.5\text{ }\mu\text{m}$)

カラム温度 : 100 (2 min), $100\text{ } 250$ ($20\text{ } /\text{min}$, 昇温), 250 (5 min)

注入口温度 : 250

検出器温度 : 250

スプリット比 : $1:50$

キャリアガス流量 : ヘリウム 2.0 ml/min

検出器 : 水素炎イオン化検出器 (FID)

植物油総溶出物量の算出

植物油総溶出物量 ($\mu\text{g/cm}^2$) は下式により算出した。ただし、 S は試料の表面積 (cm^2) とした。

$$\text{植物油総溶出物量} = \frac{W_a - (W_b - W_c)}{S} \times 1000$$

$$= \frac{W_a - W_b + W_c}{S} \times 1000$$

2) EN 法

EN 1186-2 に準じた。試料は 1) 改良法の ~ と同様に操作して W_a 及び W_b mg を求めたのち、以下の操作を行った。

試料中の残存植物油の抽出

試料を細切しソックスレー抽出器に入れ、ナスフラスコに内標準溶液 10 ml 及びペンタン 200 ml を加え 7 時間抽出した。抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素気流

下で乾固した。上記の抽出操作を植物油が定量限界以下になるまで繰り返した。

植物油のメチルエステル化

乾固した残渣にヘプタン 10 ml を加えて溶解し、水酸化カリウムメタノール溶液 10 ml を加え、冷却管を付けて 10 分間還流した。冷却管の上部から三フッ化ホウ素メタノール溶液 5 ml を加え 2 分間還流した。冷後、飽和硫酸ナトリウム溶液 20 ml を加えて 5 分間振とうし、50 ml ネスラー管に移し静置した。

植物油の定量

1) 改良法の と同様の条件でガスクロマトグラフィーを行い、内標準法で試料中の残存植物油量 (W_c , mg) を求めた。

植物油総溶出物量の算出

1) 改良法の と同じ式を用いて植物油総溶出物量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を算出した。

5. 試料中の残存植物油の抽出法の検討

1) 抽出試験用試料の調製

試料は 10 cm × 10 cm (天然ゴムは 3 cm × 3 cm) に切断し、4.1) ~ に従い抽出試験用試料を調製した。試料は検体ごとに溶出前の試料恒量 (W_a , mg)、溶出後の試料恒量 (W_b , mg) を求め、溶出前後の質量差 ($W_b - W_a$, mg) を算出した。調製した試料は質量差の分布がほぼ同等になるように 3 検体ずつ 1 組とし、抽出条件の比較に用いた。ただし、抽出溶媒の検討は 1 検体ずつのため、得られたオリブ油濃度を溶出前後の質量差 ($W_b - W_a$, mg) で補正した。

植物油への溶出において、植物油としてポリ塩化ビニルはサフラワー油、それ以外の試料はオリブ油を用いた。また溶出条件は、シリコーンゴム及び天然ゴムは 60 30 分間、ポリエチレン、ポリプロピレン及びナイロンは 80 60 分間、ポリ塩化ビニルは 40 30 分間とした。

2) シリコーンゴムの抽出条件の検討

抽出溶媒

シリコーンゴムの抽出試験用試料に、ヘキサン、ヘキサン:エタノール(95:5)またはシクロヘキサン 190 ml と内標準溶液 10 ml を加えて、40 で振とう抽出を行った。なお、ヘキサンは 60 でも行った。0、60、120、240 及び 360 分後に抽出液を各 4 ml 採取し、絶対検量線法で抽出液中のオリブ油濃度を定量した。

抽出時間

シリコーンゴムの抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml と内標準溶液 10 ml を加えて、40 で振とう抽出を行った。0、15、30、60、120、240 及び 360 分後に抽出液を各 4 ml 採取し、絶対検量線法および内標準法によりオリブ油量を定量した。

抽出回数

シリコーンゴムの抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加え 40 120 分間振とうして抽出液を全量採取したのち、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さらに 3 回繰り返した。1~4 回目の各抽出液、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中のオリブ油量を絶対検量線法により定量した。また、1 回目の抽出液と各混液については内標準法でも定量した。

3) その他の材質試料の抽出条件の検討

シリコーンゴム以外の材質の抽出試験用試料にシクロヘキサン 190 ml 及び内標準溶液 10 ml を加え、以下 2) と同様に操作した。ただし、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニルの追加抽出は 2 回とし、1~3 回目を合わせた抽出液は測定しなかった。

6. 改良法と EN 法の同等性の検証

ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、

ポリ塩化ビニル、シリコンゴム及び天然ゴム製の6種類の試料各3検体を用いて、4.1)に示した改良法及び4.2)に示したEN法に従って操作した。検体ごとに溶出前後の質量差($W_b - W_a$ mg)、試料中に残存する植物油量(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を求め、それぞれの値の平均値と標準偏差を比較して同等性を検証した。

C. 研究結果及び考察

1. 植物油の定量限界及び検量線の検討

1) オリーブ油の定量限界と検量線

昨年度は0.5~1500 mgのオリーブ油をメチルエステル化し、主脂肪酸であるオレイン酸のメチルエステル体(オレイン酸メチル)を定量用ピークとして絶対検量線法で検量線を作成した。その結果、全範囲で極めて良好な直線性が得られ、定量限界を0.5 mgとした。

しかし、そのガスクロマトグラムからはさらに低濃度でも定量可能と推測された。

そこで、定量限界を再検討するためにオリーブ油0、0.05、0.1及び0.5 mgをメチルエステル化してGC-FIDで測定した(図1)。昨年度定量限界としたオリーブ油0.5 mgではオレイン酸メチル(保持時間11.0分)のS/N比は100以上であった。一方、オリーブ油0.1及び0.05 mgでは、S/N比は約20及び10でピーク形状も良好であった。また、ブランクに妨害は認められなかった。そこで、S/N比約10のオリーブ油0.05 mgを定量限界とした。

次に、オリーブ油0.05~1500 mgに内標準を加えて測定を行い、絶対検量線法及び内標準法により検量線を作成した(図2)。検量線は両法とも極めて良好な直線性を示した。なかでも、内標準法の R^2 は0.9999であり、絶対検量線法の0.9974よりさらに良好な直線性を示した。

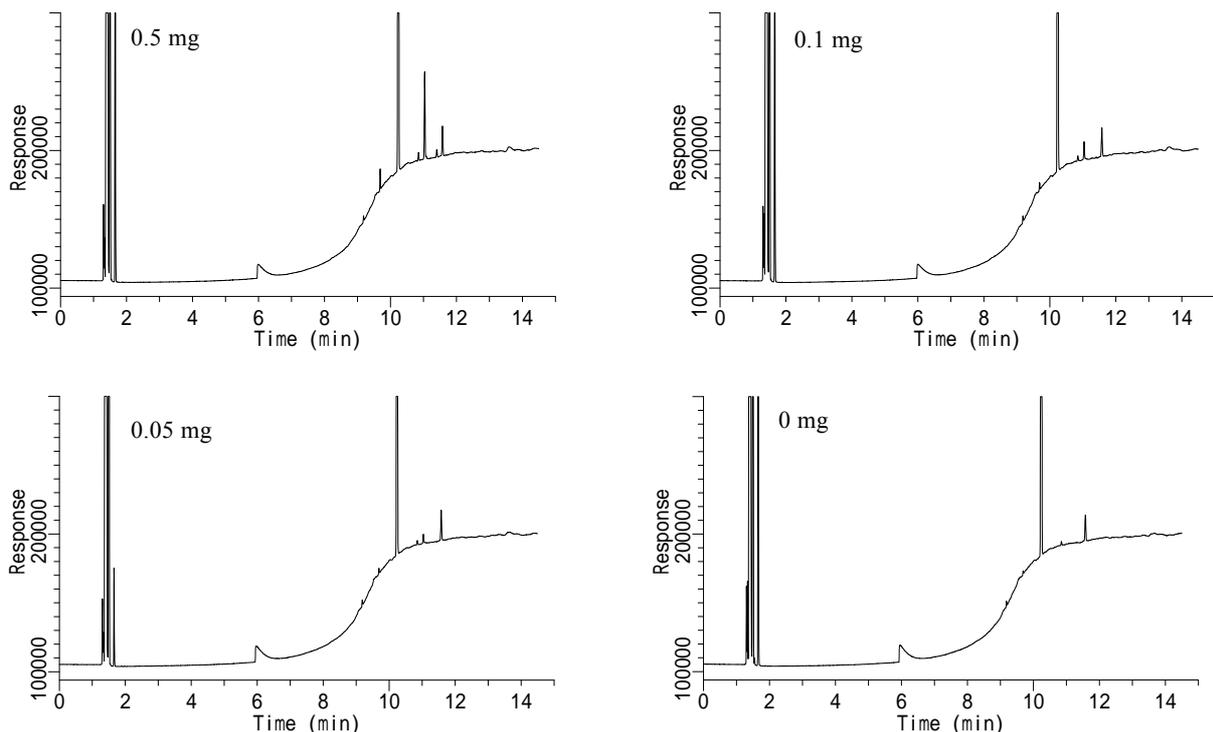


図1 オリーブ油(0, 0.05, 0.1 及び 0.5 mg)のガスクロマトグラム

保持時間：内標準 10.2 min, オレイン酸メチル 11.0 min

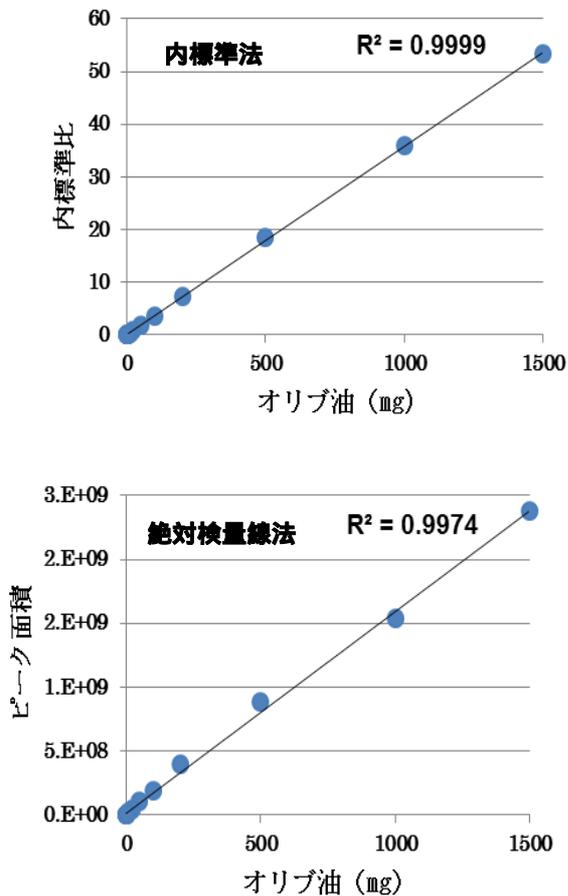


図2 オリブ油検量線(0.05 ~ 1500 mg)

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 10.4%、リノール酸 7.0%である²⁾。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。

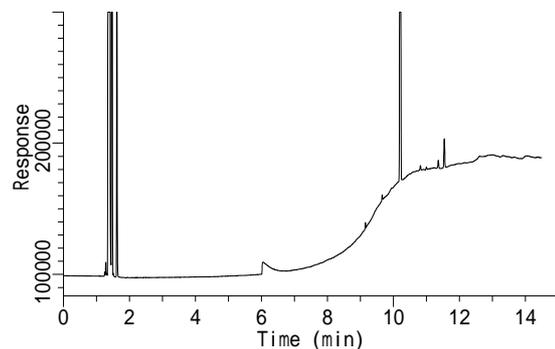


図3 サフラワー油(0.05 mg)のガスクロマトグラム 保持時間：内標準 10.2 min, リノール酸メチル 11.3 min

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。

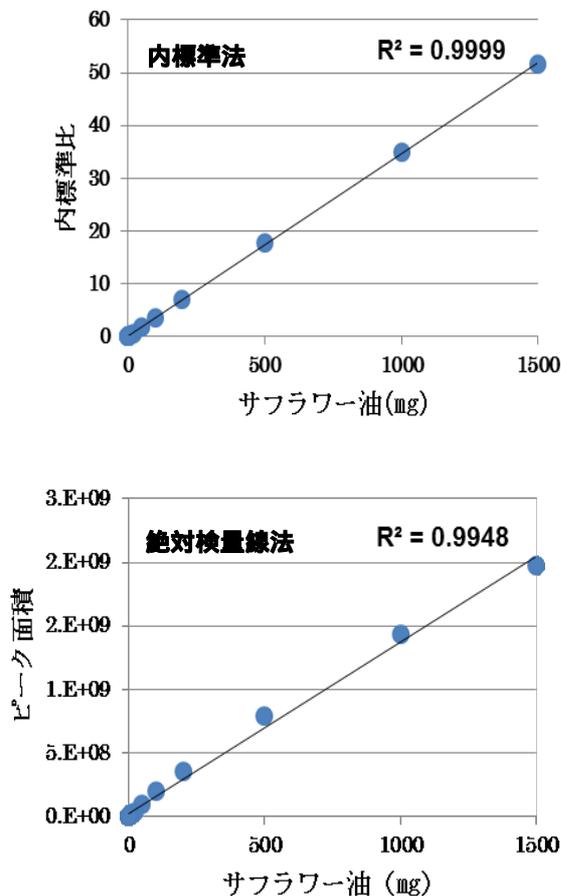


図4 サフラワー油検量線 (0.05 ~ 1500 mg)

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。

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 30 分間とした。シリコンゴムシート 10 cm × 10 cm (表面積 200 cm²) を用い、以上の条件で 4) ~ に従って操作し、抽出試験用試料を調製した。

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 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 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

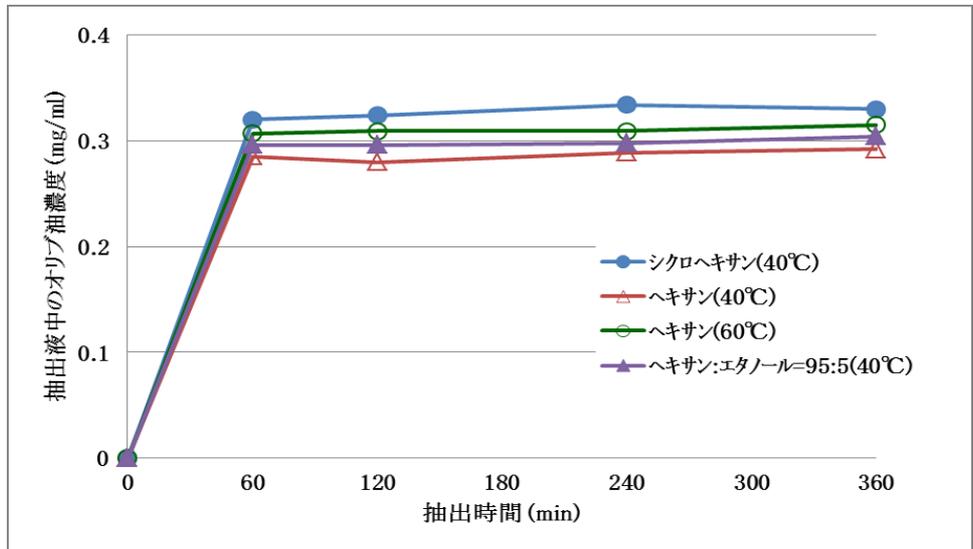


図5 各抽出条件における抽出液中のオリブ油濃度の経時変化

く操作も簡便な 40 とし、ヘキサンでは 60 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)、ヘキサン・エタノール(95:5)であり、ヘキサン(40)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 であるため 40 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。

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 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

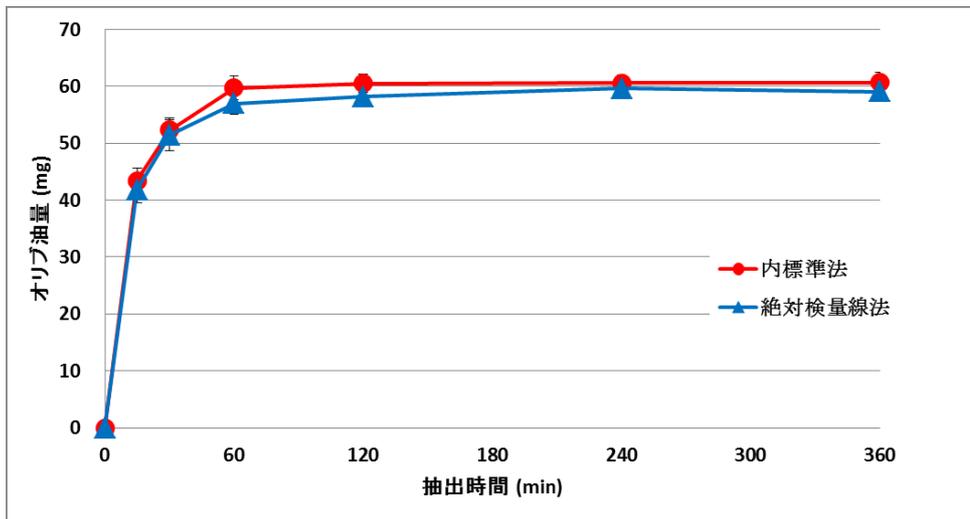


図6 シクロヘキサン 40 におけるオリブ油量の経時変化

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。

抽出回数

シクロヘキサン 40 120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 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回目で定量限界未達と

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回目を含ませた抽出液、1~3回目を含ま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回を含ませた抽出液では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40 120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含ま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

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。

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

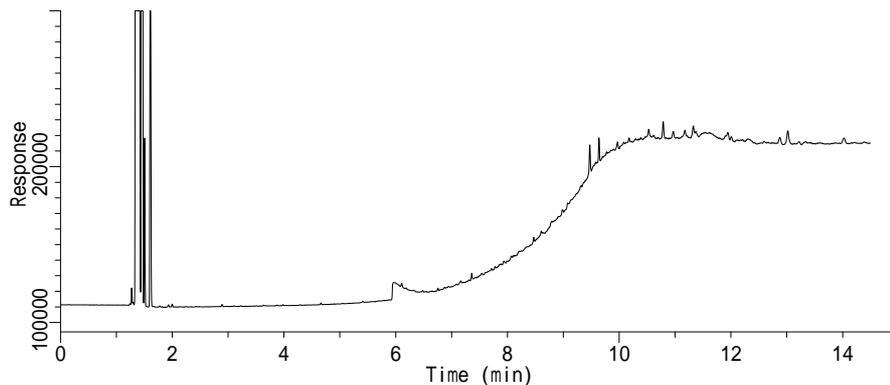
各 3 試行で試験を行い、平均値 ± 標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg

3) 天然ゴムにおける抽出条件の検討

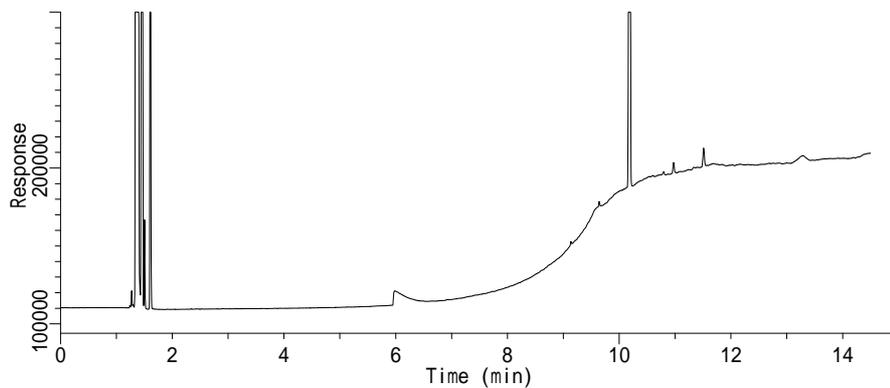
抽出試験用試料の調製

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

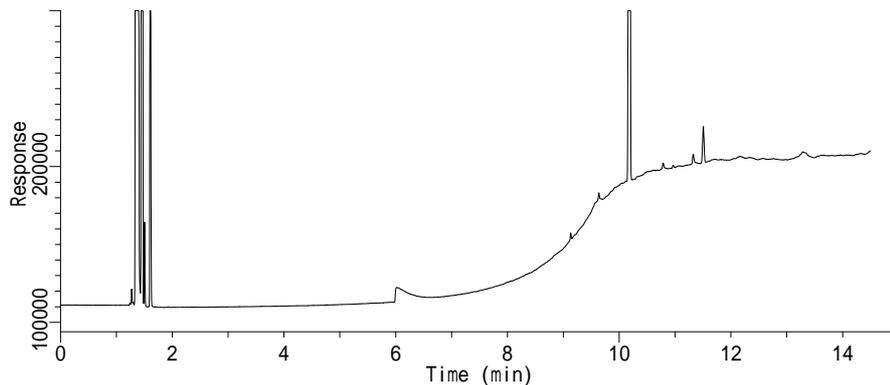
がしばしばあった。EN 法では、残存オリブ油量が 500 mg を超えると定量できないため、試料サイズを小さくして試験をやりなおすように定めている。今回の改良法では 1500 mg まで定量可能であるが、両試験法の比較を行う際には同一サイズの試料を使用することが



天然ゴム (ブランク、3 cm x 3 cm)



オリブ油 (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。

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 分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 回繰り返す、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

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 60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 30分間、40 30分間、40 1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 60分間より残存量は多かった。また、60 30分間では若干収縮が認められたが、40 30分間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 30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 30分間の浸漬により調製した。

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 30分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 60分間の振とう抽出の操作を2回繰り返し、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。

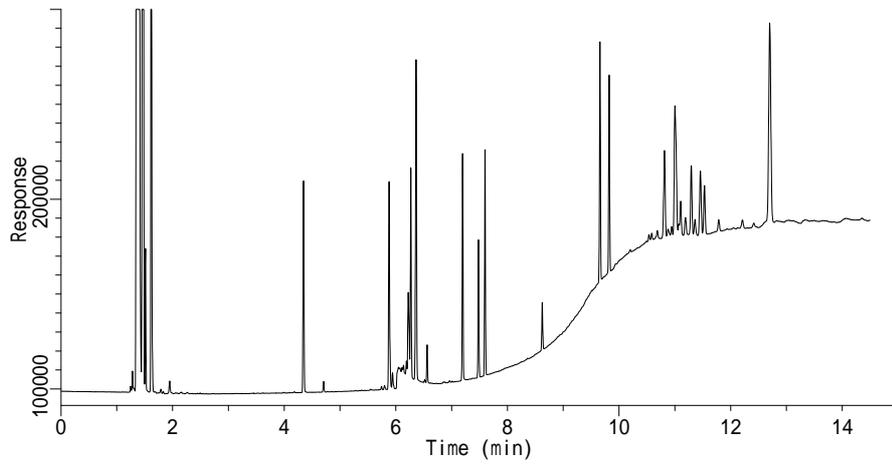
一方、内標準法では1回目の抽出液も1回目と2回目を合わせた抽出液もサフラワー油量は11.26及び11.29 mgとよく一致していた。すなわち、ポリ塩化ビニルにおいても抽出1回目で試料に残存していたサフラワー油と内標準は平衡に達しており、内標準法であれば、抽出は1回で十分であることが示された。

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40 120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。

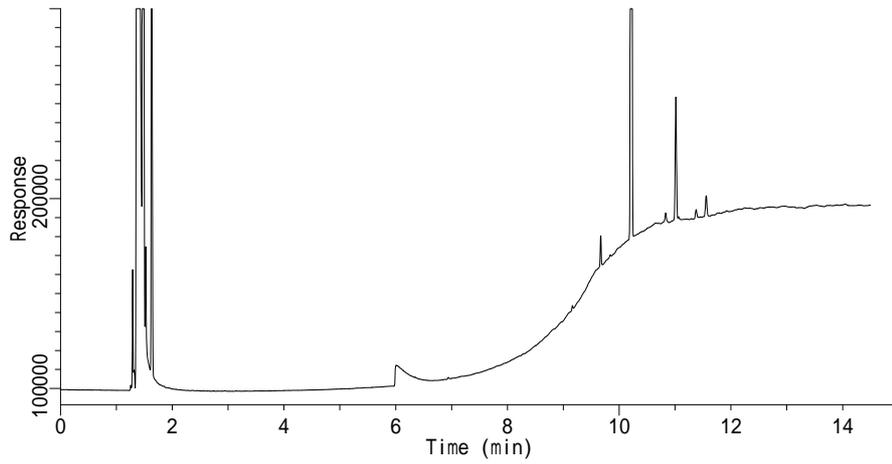
表5 ポリ塩化ビニルにおける抽出回数と得られたサフラワー油量

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

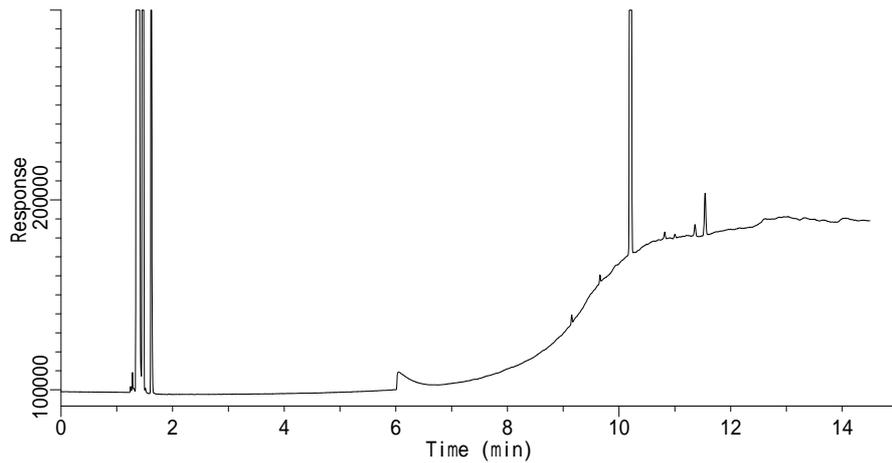
各3試行で試験を行い平均値 ± 標準偏差で記載した。ND < 0.05 mg



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試料はオリーブ油を使用した。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 200 cm²) 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ー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、40-120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 60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 60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 60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 30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 30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 30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).