

厚生労働科学研究費補助金

参考

食品安全確保研究事業

食品用器具・容器包装等の  
安全性確保に関する研究

平成13年度～15年度 総合研究報告書

主任研究者 河村 葉子

平成16(2004)年4月



### Ⅲ. 器具・容器包装の規格試験法の精度向上に関する研究

#### 1. クレゾールリン酸エステル試験法

クレゾールリン酸エステル (TCP) の規格試験法は TCP を加水分解してクレゾールとして測定しているが、有害試薬である四塩化炭素を使用しており、しかも操作が煩雑で回収率や再現性に問題がある。そこで TCP を分解せず直接分析する方法を検討した。HPLC-UV を用いる測定条件を検討したところ、Inertsil Ph-3 により異性体混合物を 1 本のピークとして検出できた。さらに試料中の他の可塑剤を除去するため、固相抽出カラムによる TCP の精製についても検討し、Sep-Pak Plus C18 により良好な分離が得られた。これらの結果から以下の試験法を確立した。細切または粉碎した試料をアセトニトリルで 37 °C 一晩抽出後濃縮し、アセトニトリル-水 (1:1) 溶液として固相抽出カラムに負荷し、アセトニトリル-水 (2:1) で溶離し、HPLC-UV で測定した。本法により添加回収試験を行ったところ、ラップフィルム、手袋、容器等において 80% 以上の良好な回収率が得られた。

#### 2. カドミウムおよび鉛材質試験法

カドミウムおよび鉛の試験において、塩酸処理した試料では高濃度の鉛が検出されるのに、公定法ではその 1/10 の測定値しか得られない事例が生じた。合成樹脂には着色剤、安定剤、充填剤として無機物を多量に含有するものがあり、灰化時に硫酸を加えることにより無機

成分が酸不溶の硫酸塩を生成し、カドミウム及び鉛の測定を妨害したと推察された。そこで、合成樹脂に添加される可能性のある無機物質の影響について検討したところ、バリウム添加で鉛の回収率が著しく影響を受け、13% と大幅に回収率が低下することが認められた。また、アルミニウムまたはバリウム添加でカドミウム、チタン及びアルミニウム、ケイ素添加で鉛の回収率が若干低下した。そこで種々検討したところ、簡便な塩酸処理を追加することにより、回収率をカドミウムでは 100%、鉛では 80% 以上に改善することができた。これらの結果から、規格試験法と同様の操作で灰化後、沈殿物の影響を除去するために塩酸 15 ~ 20 ml を加えてかき混ぜ、水浴上で蒸発乾固し、冷後 0.1 mol/L の硝酸に溶解し試験溶液を調製する方法を確立した。そこで、規格試験法と本法について、バリウム含有の市販ストローを用いてカドミウム及び鉛の添加回収試験を行ったところ、規格試験法では鉛の回収率が 9 ~ 18% と極めて低かったが、本法では 80 ~ 89% と良好な回収率が得られ、共存する無機物質の影響を受けない精度のよい分析法を確立することができた。また、規格試験法にはポーラログラフ法が併記されているが、有害試薬である水銀を用いることから削除し、カドミウムおよび鉛を同時に測定可能な ICP (誘導結合プラズマ) 発光分光法を併記することが望ましい。

#### 3. 重金属試験法

合成樹脂製及びゴム製器具及び容器包装の溶出試験として、重金属試験が設定されているが、この試験法は「器具及び容器包装の規格基準」には記載がなく、そのような場合には「添加物の規格基準」に準拠するように指示されている。ところが「添加物の規格基

準」の重金属試験法を実施するためには、操作法の種類、鉛標準溶液の使用量及び試験溶液の採取量等を規定しておく必要があるが、それらが「器具・容器包装の規格基準」では示されておらず、試験が困難である。そこで、現行及びこれまでの「食品、添加物等の規格基準」について調査を行い、「器具及び容器包装の規格基準」における重金属試験の変遷及び問題点の経緯を「食品衛生法」等から調査した。その結果、不足事項を追加するだけでなく重金属試験法を器具・容器包装の規格基準の中に記載するといった抜本的な改正が必要と考えられた。

#### 4. ジブチルスズ化合物試験法

ジブチルスズ化合物は、食品以外の一般用途のポリ塩化ビニルの安定剤として使用されているが、毒性が高いため食品衛生法ではポリ塩化ビニル中のジブチルスズ化合物は塩化物として 50 ppm 以下と定められている。しかし、現行のジブチルスズ化合物試験法は抽出に有害試薬である四塩化炭素を用いているほか、操作が煩雑であり、回収率も悪い、また検出には分離能が低い紙クロマトグラフィーを用いるなど問題が多い。そこで有害試薬を用いず、簡便で分析精度の優れた試験法の検討を行った。

その結果、塩酸を含むアセトン及び *n*-ヘキサンの混液で溶媒抽出し、テトラエチルホウ酸ナトリウムによりエチル化を行った後、GC/MS により定量する代替法を確立した。本法は定量限界 1.0 µg/g、回収率 90.5 ~ 96.6 % と極めて良好であり、ばらつきも少なく優れた試験法であった。

#### 5. アンチモン及びゲルマニウム溶出試験法

アンチモン及びゲルマニウムは、ポリエチレンテレフタレート (PET) の縮合触媒とし

て添加されており、最終製品中に残留する。それらの毒性のため、食品衛生法では、溶出試験でアンチモン 0.05 ppm 以下、ゲルマニウム 0.1 ppm 以下と定めている。現行の規格試験は吸光度法が用いられているが、アンチモン試験は回収率が悪く、また灰化に長時間を必要とし、ゲルマニウム試験は灰化及び抽出操作に長時間を必要とし、有害試薬である四塩化炭素を使用する等の問題がある。そこで、溶出試験溶液である 4 % 酢酸溶出液を直接試験溶液としてフレイムレス原子吸光光度計、ICP または ICP-MS で測定する、煩雑な前処理操作を必要としない方法を検討した。

その結果、試料溶液及びアンチモン、ゲルマニウム標準溶液は、フレイムレス原子吸光光度計、ICP、ICP-MS で干渉作用の影響を受けず、精度良く分析することができた。また、市販の PET 容器を使用してアンチモン及びゲルマニウムの溶出試験の添加回収実験を行ったところ、回収率、相対標準偏差も良好な結果が得られた。本法は、簡便、迅速で有害試薬を用いない安全な分析法であり、且つ高精度、高感度にアンチモン及びゲルマニウムを分析する有用な試験法である。

#### 6. 金属缶のエピクロロヒドリン溶出試験法

エピクロロヒドリンは、金属缶の内面塗装剤として用いられるエポキシ樹脂の原料であり、樹脂中に残存する可能性がある。毒性が高いため食品衛生法では、溶出試験で 0.5 ppm 以下と定められている。しかし、現行のエピクロロヒドリン試験法はパックドカラムによるガスクロマトグラフィー法が規定されており、検出感度が 2 ~ 3 ppm と悪く、通常の浸出用液を満たす調製法では基準値付近の測定を行うことが不可能である。これを補うために公定法では変則的な溶出条件が採

用されているが、恒温器の温度管理やルペンタンの揮散などの実務分析上の問題点を抱えている。そこで、高感度分析法の確立を目的としてキャピラリーカラムによるガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析を用いる試験法について検討した。その結果、変則的な試験溶液の調製を行うことなく、基準値の 1/10 以下 (0.05 ppm) を容易に精度良く測定することが可能となった。

#### 7. フェノール試験法の検討

器具及び容器包装の規格基準におけるフェノール試験法は、対象とする試料によって、ゴム及び金属缶では 4-アミノアンチピリン法、合成樹脂では臭素溶液による方法 (トリブロモ法) が規定されている。しかし、トリブロモ法は感度が悪く、劇物である臭素を用いる等の問題がある。

そこで、トリブロモ法が適用されているメラミン樹脂等について 4-アミノアンチピリン法が適用できるか検討を行った。4-アミノアンチピリン法による添加回収試験 (5 及び 25 µg/ml) の結果、平均回収率は 101 ~ 109 % と良好であり、妨害等もみられず、トリブロモ法を 4-アミノアンチピリン法に代替しても問題ないと考えられた。

また、4-アミノアンチピリン法に記載されているホウ酸緩衝液が溶解しにくいことから、適切な緩衝液の濃度について検討した。その結果、第 1 液、2 液とも 0.1M にし、等量混合した緩衝液を用いることにより良好に測定することができた。

#### 8. 塩化ビニル及び塩化ビニリデン試験法

ポリ塩化ビニル及びポリ塩化ビニリデンはそれぞれ塩化ビニルと塩化ビニリデンを原料モノマーとし、それらを重合させて製造され

るが、その過程で未反応のモノマーが製品中に残存することがある。これらのモノマーは発がん性が認められ、もしくは疑われていることから、食品衛生法ではポリ塩化ビニル中の塩化ビニルの残存量を 1 ppm 以下、ポリ塩化ビニリデン中の塩化ビニリデンを 6 ppm 以下に規制している。いずれの規格試験法もバックドカラムを用いたガスクロマトグラフ (GC) 法を採用しており、現在普及しているキャピラリーカラムを用いた GC 法に比較して測定感度やピークの分離性能が劣る。また、溶解した樹脂を直接 GC に注入することから、カラムの汚染や劣化の可能性がある。さらに塩化ビニリデンにおいては、オゾン層破壊物質に指定され、生産が全廃されたために入手困難な四塩化炭素を溶媒に用いている。そこで、これらの規格試験法の代替法として樹脂を *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) に溶解し、キャピラリーカラムを用いたヘッドスペース法で分析したところ、両化合物が同じ条件で、しかもきょう雑成分の影響を受けずに再現性良く測定することができた。検出器に水素炎イオン化検出器を用いた場合の定量限界は塩化ビニルが 0.1 ppm、塩化ビニリデンが 0.6 ppm といずれも基準値の 1/10 まで測定可能であった。なお、質量分析計を検出器に用いた場合は測定感度がさらに 10 倍向上し、しかもピークの確認も可能である。

#### 9. 揮発性物質試験法

ポリスチレンには未反応のスチレンや原料由来の不純物が含まれることが知られており、食品衛生法ではスチレンを含む揮発性物質 (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、*m*-プロピルベンゼン) の残存量を規制している。規格試験法はバックドカラムを用いた GC 直接注入法を採用し

ているが、パックドカラムは現在多くの試験機関で使用されているキャピラリーカラムに比べて分離性能が劣り、きょう雑成分の妨害を受けやすい。そこで、パックドカラムとキャピラリーカラムの両者を用い、定量限界、絶対検量線法及び内標準法による添加回収率について比較検討した。また、ヘッドスペース法と直接注入法の検出感度、回収率及び繰り返し測定精度についても比較検討した。

規格試験法と同様に試料を DMF に溶解し、キャピラリーカラムに直接注入した場合、ピークの形状は保持時間が長い化合物ほどブロードになった。そこで、DMF より沸点が低く、注入口で気化しやすいテトラヒドロフラン (THF) を用いて試料を溶解したところ、ピーク形状が良好なガスクロマトグラムが得られた。また THF は粘性が低く、オートサンプラーの使用も可能であることから、キャピラリーカラムを用いた直接注入法での試料の溶媒として適していると考えられた。直接注入法での定量限界はキャピラリーカラムがやや優れていた。

また、市販のポリスチレン製品をそれぞれの方法で測定したところ、パックドカラムを用いた直接注入法では、きょう雑ピークとの分離が不十分なためにエチルベンゼン、イソプロピルベンゼン及びスチレンの定量値が他法に比較して高い製品が認められ、キャピラリーカラムによる分離が不可欠であることが確認された。キャピラリー法において直接注入法とヘッドスペース法はほぼ同等であったが、再現性において直接注入法がやや優れていた。以上の結果と操作が簡便なことから代替法としてはキャピラリーカラムを用いた直接注入法が適していると結論された。

#### 10. カプロラクタム及びメタクリル酸メチ

#### ル試験法

食品衛生法ではナイロンを主成分とする合成樹脂ではカプロラクタムを、また、ポリメタクリル酸メチルを主成分とする合成樹脂ではメタクリル酸メチルをそれぞれ 20%エタノール溶出液中に 15 ppm を超えて検出してはならないと規定している。これらの試験法にもパックドカラムを用いた GC 法が採用されていることから、キャピラリーカラムへの転換について検討した。

強極性の HP-WAX (0.25 mm i.d.×30m, 膜厚 0.5 μm) と無極性で膜厚の DB-1 (0.32 mm i.d.×30 m, 膜厚 5 μm) の 2 種類のキャピラリーカラムを用いてカプロラクタムとメタクリル酸メチルを測定した。両カラムでピーク形状及び検出感度に差は無かったが、カプロラクタムを HP-WAX で測定したガスクロマトグラムではベースラインの上昇が認められた。DB-1 を用いて得られる検量線はいずれの化合物も原点をとる直線性を示し、再現性も良好であったことから、キャピラリーカラムには両者とも膜厚 5 μm の DB-1 カラムが適当であると判断した。

平成13年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業

# 食品用器具・容器包装等の 安全性確保に関する研究

## 総括・分担研究報告書

平成14(2002)年4月

主任研究者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究者 鎌田 国広 東京都立衛生研究所

分担研究者 外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所





器具・容器包装の規格試験法の精度向上に関する研究

分担研究者 鎌田 国広 東京都立衛生研究所

研究要旨

食品衛生法の器具・容器包装に関する規格試験法の中には、回収率や再現性に問題があり精度管理に適合困難なもの、規制されている有害試薬を使用しているもの、現在の科学水準に対応が不十分なものなどがあり、これらの規格試験法の整備が求められている。そこで、今年度はポリ塩化ビニル中のクレゾールリン酸エステルの材質試験法、合成樹脂一般規格のカドミウム及び鉛試験法及び合成樹脂一般規格の重金属試験について検討を行った。

クレゾールリン酸エステル(TCP)は、ポリ塩化ビニル(PVC)の可塑剤として食品以外の用途には使用されているが、毒性が強いことから食品衛生法では PVC 材質中に 1,000 ppm 以下と定めている。その規格試験法は TCP を加水分解してクレゾールとして測定しているが、有害試薬である四塩化炭素を使用しており、しかも操作が煩雑で回収率や再現性に問題がある。そこで TCP を分解せず直接分析する方法を検討した。TCP 標準品を GC/MS で測定したところ、*m* 及び *p*-クレゾールからなる 4 種類の異性体混合物であったが、個別の標準品は入手できない。そこで各異性体の検出感度がほぼ等しい HPLC-UV を用いる測定条件を検討したところ、Inertsil Ph-3 により異性体混合物を 1 本のピークとして検出できた。さらに試料中の他の可塑剤を除去するため、固相抽出カラムによる TCP の精製についても検討し、Sep-Pak Plus C18 により良好な分離が得られた。これらの結果から以下の試験法を確立した。細切または粉碎した試料をアセトニトリルで 37℃一晩抽出後濃縮し、アセトニトリル-水 (1:1) 溶液として固相抽出カラムに負荷し、アセトニトリル-水 (2:1) で溶離し、HPLC-UV で測定した。本法について添加回収試験を行ったところ、ラップフィルム、手袋、容器等において 80%以上の良好な回収率が得られた。

次に、合成樹脂製の器具又は容器包装一般規格材質試験のカドミウムおよび鉛の規格において、塩酸処理した試料では高濃度の鉛が検出されるのに、公定法ではその1/10の測定値しか得られない事例が生じた。食品衛生法では、材質中のカドミウム及び鉛を 100 ppm 以上含有してはならないとし、その規格試験法は試料に硫酸を加え 450℃で乾式灰化後、灰化物を 0.1mol/L 硝酸に溶解し試験溶液とし、原子吸光法またはポーラログラフ法により測定すると定められている。しかし、合成樹脂には着色剤、安定剤、充填剤として無機物を多量に含有するものがあり、灰化時に硫酸を加えることにより無機成分が酸不溶の硫酸塩を生成し、カドミウム及び鉛の測定を妨害したことが推察される。

そこで、合成樹脂に添加される可能性のある無機物質が規格試験法によるカドミウム及び鉛の回収率に及ぼす影響について検討した。カドミウム及び鉛100 $\mu$ g に対し各種金属 1,000 $\mu$ g を添加し回収率を求めた結果、バリウム添加で鉛の回収率が著しく影響を受け、13%と大幅に回収率が低下することが認められた。また、アルミニウム、バリウム添加でカドミウムの回収率が97%、90%、チタン、アルミニウム、ケイ素添加で鉛の回収率が95%、94%、77%と若干低下した。そこで種々検討したところ、簡便な塩酸処理を追加することにより、回収率をカドミウムでは100%、鉛では80%以上に改善することができた。これらの結果から、規格試験法と同様の操作で灰化後、沈殿物の影響を除去するために塩酸15~20mlを加えかき混ぜて、水浴上で蒸発乾固し、冷後0.1mol/Lの硝酸に溶解し試験溶液を調製する方法を確立した。そこで、規格試験法と本法について、バリウム含有の市販ストローを用いてカドミウム及び鉛の添加回収試験を行ったところ、規格試験法では鉛の回収率が9~18%と極めて低かったが、本法では80~89%と良好な回収率が得られ、共存する無機物質の影響を受けない精度のよい分析法を確立することができた。また、規格試験法にはポーログラフ法が併記されているが、有害試薬である水銀を用いることから削除することが望ましい。

一方、合成樹脂製及びゴム製器具及び容器包装の一般規格の溶出試験として、重金属試験が設定されているが、この試験は「添加物の規格基準」に準拠するように指示されている。ところが「添加物の規格基準」の重金属試験法を実施するためには、操作法の種類、鉛標準溶液の使用量及び試験溶液の採取量等を規定しておく必要があるが、それらが「器具・容器包装の規格基準」では示されておらず、現状では試験が困難である。そこで、現行及びこれまでの「食品、添加物等の規格基準」について調査を行い、「器具及び容器包装の規格基準」における重金属試験の変遷及び問題の経緯を明らかにした。その結果、不足事項を追加するだけでなく、重金属試験法を器具・容器包装の規格基準の中に記載するといった抜本的な改正が必要であると考えられる。

#### 研究協力者

金子 令子	東京都立衛生研究所	川井 信子	大阪市立環境科学研究所
船山 恵市	東京都立衛生研究所	山口 之彦	大阪市立環境科学研究所
羽石奈穂子	東京都立衛生研究所	尾崎 麻子	大阪市立環境科学研究所
河村 葉子	国立医薬品食品衛生研究所	大野 浩之	名古屋市衛生研究所
六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所	鈴木 昌子	名古屋市衛生研究所
渡辺 悠二	財)化学技術戦略推進機構		
池辺 克彦	大阪府立公衆衛生研究所		
柿本 幸子	大阪府立公衆衛生研究所		

## <その1>ポリ塩化ビニルにおけるクレゾールリン酸エステル試験法の改良

主任研究者 河村葉子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 六鹿元雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 渡辺悠二 財)化学技術戦略推進機構

### A. 研究目的

クレゾールリン酸エステル(TCP)は、リン酸トリクレジル、トリクレジールフォスフェートとも呼ばれ、3個のクレゾールとリン酸とのエステル体である(CAS No. 1330-78-5)。クレゾールにオルト(*o*)、メタ(*m*)、パラ(*p*)体が存在するため、工業品は異性体の混合物として流通している。不燃性、柔軟性、耐水性、耐熱性があり、ポリ塩化ビニルの耐候性、難燃性に優れた可塑剤として電線被覆、農業用ビニル、建材などに用いられている。

しかし、TCPは毒性があり、大量摂取した場合、悪心、嘔吐、腹痛、下痢などがみられ、その後遅延性の末梢及び中枢神経症状が発症する。特に $o$ -クレゾール体は毒性が強いことで知られる。ヒトの場合1~2 g程度の経口摂取で自覚症状がみられ、マウスLD<sub>50</sub>は $o$ -体の含有量により、2.4 g/kg体重(37%含有)及び7.5 g/kg体重(1.1%含有)と報告されている。

そのため、食品衛生法ではTCPをポリ塩化ビニルの材質中に1,000 ppm以下と定めている。この規格値は有効使用量の数百分の1程度で可塑剤としての効果が期待できない量である。測定の簡便性のために設定された数値であり、実質的には使用禁止を意味する。

食品衛生法で定める規格試験は、TCPを加水分解してクレゾールとし、ガスクロマトグラフィーで測定している。この試験法は抽出に有害試薬である四塩化炭素を用いている上に、抽出に4時間、アルカリ分解に2時間の還流を行い、その後液液分配を行

うなど、操作が煩雑で長時間を要する。また、定性、定量に用いるクレゾール標準溶液の異性体混合比が実際の製品とは一致していない。また、この試験法の回収率や再現性等が必ずしもよくない。

そこで、TCPを加水分解することなく直接分析することにより、四塩化炭素を使用せず、しかも簡便で精度の高い試験法を確立することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

ポリ塩化ビニル無添加パウダー

ポリ塩化ビニル製手袋、ラップフィルム、ソフトイ、容器、パイプ

ポリ塩化ビニル製クレゾールリン酸エステル含有シート(厚さ 3 mm) : TCP添加量が3.1、6.1及び8.8%の3種類、特注品、

#### 2. 試薬

クレゾールリン酸エステル(リン酸トリクレジル、TCP)(異性体混合物) : 東京化成工業(株)製、アルドリッチ社製(純度90%以上)、和光純薬工業(株)製(TLCにより純度98%以上)

リン酸- $o$ -トリクレジル( $o, o, o$ -TCP) : GCにより純度96%以上、東京化成工業(株)製

リン酸- $m$ -トリクレジル( $m, m, m$ -TCP) : 純度97%以上、ACROS ORGANICS社製

リン酸- $p$ -トリクレジル( $p, p, p$ -TCP) : 純度98%以上、ACROS ORGANICS社製

リン酸ジフェニル2-エチルヘキシル : 東京化成工業(株)製

リン酸ジフェニルクレジル(異性体混合

物)：東京化成工業(株)製

ヘキサン、アセトン：残留農薬分析用、シグマアルドリッチジャパン(株)製

アセトニトリル：HPLC用、シグマアルドリッチジャパン(株)製

水：MILLI-Q SP (Millipore社製)により精製した超純水

固相抽出カートリッジ：Sep-Pak Plus C18 (360 mg)、OASIS HLB (60 mg) 以上 Waters社製、GL-Pak PLS-2 (270 mg) ジーエルサイエンス製

フィルター：サンプレップ<sup>®</sup>LCR 13-LH (孔径 0.5 mm、直径13 mm) Millipore社製

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ポンプ LC-10AD、紫外可視検出器 SPD-10AVvp、カラムオープン CTO-10A、コントローラー SCL-10A、データ処理装置 C-R7A plus 以上 島津製作所製

ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)：ガスクロマトグラフ 6890、質量分析計 5973 N 以上Agilent社製、コンピューター Vectra VL、Hewlett Packard社製

減圧遠心濃縮器：CVE-100 東京理化器械(株)製

### 4. GC/MS測定条件

カラム：キャピラリーカラム DB-1 (内径 0.25 mm、長さ15 m、膜厚 0.1mm) J&W Scientific社製

カラム温度：50℃-20℃/min-300℃ (10 min)

注入口温度：250℃

インレット温度：280℃

キャリアガス：He、3 mL/min

注入量：1 μL

注入モード：スプリットレス

イオン化電圧：70 eV

イオン加速電圧：1.8 kV

測定モード：スキャン

スキャンレンジ： $m/z$  40~700

### 5. HPLC測定条件

カラム：Inertsil Ph-3 (4.6 mm i. d. × 250 mm) ジーエルサイエンス製

ガードカラム：ステンレスカラム(1.0 mm i. d. × 45 mm) にWhatman社製ODSゲルを充てんしたもの

移動相：65%アセトニトリル/水

カラム温度：50℃

注入量：20 μL

検出器：UV (264 nm)

### 6. 試験溶液の調製

試料0.5 gを細切または粉碎後にアセトニトリル15 mLを加え、37℃で一晩放置した。ろ過及び濃縮後、アセトニトリルを加え10 mLとした。その2 mLに水2 mLを加えたものを、固相抽出カートリッジ Sep-Pak Plus C18 (アセトニトリル5 mL及びアセトニトリル-水(1:1) 5 mLでコンディショニング後)に負荷した。アセトニトリル-水(1:1) 5 mLで洗浄した後、アセトニトリル-水(2:1)で溶出し、溶出液を10 mLに定容して試験溶液とした。

### 7. 添加回収試験

細切または粉碎した試料 0.5 gを精秤し、TCPアセトン溶液を1,000 ppmとなるように添加し、30分放置後、本法に従い試験操作を行った。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. クレゾールリン酸エステル標準品

TCP標準品のアセトン溶液をGC/MSで測定したところ、図1に示すように、9.07分にメインピーク、8.96及び9.17分にその1/2程度のピーク、9.26分に1/8程度のピークの4本のピークが検出された。

一方、単一のクレゾールからなる *o,o,o*

TCP、*m, m, m*-TCP及び *p, p, p*-TCPをGC/MSで測定したところ、いずれも単一ピークを示し、図2に示すようなマススペクトル及び保持時間であった。

保持時間及びマススペクトルから、TCP標準品の4本のピークのうち、8.96分は *m, m, m*-TCP、9.26分は *p, p, p*-TCPと同定された。残りの9.07分及び9.17分のピークも類似したマススペクトルを示すことから、*m*及び *p*-クレゾールからなるTCPと考えられ、保持時間から前者は *m, m, p*-TCP、後者は *m, p, p*-TCPと推定された。

入手した3社の標準品のクロマトグラムはよく一致したパターンを示した。このことから、一般に流通しているTCPは、*m*-体含有量が高い *m*及び *p*-クレゾール混合物とリン酸との反応生成物であり、*o*-クレゾールを含む異性体は含有していないと推定される。

GC/MSではTCPのピークが4本に分離し、また *m, m, p*-TCP及び *m, p, p*-TCPの標準品が市販されていないことから、HPLCにより1本のピークとしてより簡便に定量する方法を検討した。

## 2. HPLCによる測定

TCP標準品、*o, o, o*-TCP、*m, m, m*-TCP及び *p, p, p*-TCPのUV吸収のスペクトルを測定したところ、これらはほぼ一致し、214 nm、264 nm及び 271 nmに極大吸収波長を示した(図3)。264 nmよりも214 nmの方が約10倍感度が高いが、フタル酸エステルも強い吸収を示すことから妨害を受けやすいと考えられた。また、264 nmでも十分な検出感度が得られたことからこれを検出波長とした。

HPLCで定量する場合には、すべてのTCP異性体を1本のピークにできれば、定量が簡便でしかも異性体比が異なった場合にも定量が可能となる。そこで、Inertsil Ph-3、

TSKgel Octyl-80Ts及び TSKgel ODS-80Tsの3種類のカラムを用いて、保持時間10分前後にピークが出現するように移動相のアセトニトリル含有量を設定して検討した。表1に示すように、いずれのカラムにおいてもTCP標準品は1本のピークを示した。しかし、TSKgel Octyl-80Ts及びTSKgel ODS-80Tsでは、*o, o, o*-TCPの保持時間が遅く、これが混在する場合には1本のピークとならなかった。一方、Inertsil Ph-3においては各異性体間の保持時間の差が最も少なく、*o, o, o*-体が中間にくることから、*o*-クレゾールを含む異性体が存在しても1本のピークとして出現すると考えられた。そこで、Inertsil Ph-3カラムを使用することとした。

上記の測定条件により、主な異性体の感度をピークの面積又は高さから比較したところ各異性体の感度は標準品に対し *o, o, o*-体、*m, m, m*-体がやや低く、*p, p, p*-体がやや高いことが分かった(表2)。しかし、TCPの主成分である *m*及び *p*-を含む異性体では検出感度は1.0に近いと推定された。

以上のことから、Inertsil Ph-3カラムを用い、TCPを1本のピークとして定量することとした。

## 3. 検量線及び定量限界

本測定条件におけるTCP標準品のHPLCクロマトグラムを図4に示した。保持時間は9.3分で、検量線は0.5 ppmから100 ppmの範囲で直線性があり、定量限界0.5 ppm、検出限界0.1 ppmであった(図5)。

## 4. 他の添加剤の影響

既報<sup>1)</sup>より本測定条件でTCPと保持時間が近い可能性のある可塑剤6種類について測定したところ、リン酸ジフェニル-2-エチルヘキシル(DPOF)、及びリン酸ジフェニル

レジル(DPCF)の一部がTCPのピークと重なった。これらの化合物をGC/MSで測定したところ、DPOFは保持時間が8.20分、ベースイオンピーク  $m/z$  251でマススペクトルもTCPと大きく異なり、TCPと容易に識別可能であった。一方、DPCFは混合物であるが、GC/MSによりその一部としてTCPを含むことが確認された。すなわち、HPLCで一致したのはTCPそのものであり、DPCFに含まれるTCPについても、もし含有量が高ければ規制の対象となると考えられた。

#### 5. 試験溶液調製法の検討

ポリ塩化ビニルに含有される化合物の調製法としては、抽出法と溶解法があるが、ポリ塩化ビニル中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)及びフタル酸ジisonニル(DINP)の試験法の検討において<sup>2)</sup>、抽出法は軟質ポリ塩化ビニルの可塑剤に対して抽出率が高く、しかも簡便であった。

そこで、PVC製の手袋及びラップフィルムにTCPを添加し抽出率を検討した。抽出溶媒としてアセトン-ヘキサン(3:7)混液とHPLCへの移行が簡便であるアセトニトリルを選択し、比較を行った。各溶媒を加え、37℃一晩放置して抽出を行ったところ、両者とも80%以上の抽出率が得られたが、アセトニトリルでは、ほぼ全量のTCPを抽出することができた。また、TCPを含有するポリ塩化ビニル製シートを用いた場合にもアセトニトリルによりほぼ90%近く抽出できた(表3)。そこで、アセトニトリルによる抽出法を用いることとした。

#### 6. 固相抽出カートリッジによる精製

本法により抽出操作を行うと、抽出液に大量の可塑剤が混入するため、このままHPLCに注入すると、HPLCクロマト上に巨大ピー

クが出現し、これら可塑剤のカラム内への残留による圧力の上昇、保持時間の変化などの問題が生じた。また、TCP測定後、溶媒グラジエントによりこれらの可塑剤を溶出させなければならいたため、分析時間も長がかかった。

そこで、固相抽出カートリッジによる試験溶液の精製を検討した。Sep-Pak Plus C18, OASIS HLB, GL-Pak PLS-2の3種のカートリッジを用い、アセトニトリル-水によりTCP及び可塑剤を溶出させた。その結果、Sep-Pak Plus C18に負荷してアセトニトリル-水(2:1)10 mLで溶出させると、TCPの回収率は97.6%と良好であり、しかもDEHPやDINPの混入もほとんどみられなかった(表4)。

また、アセトニトリル-水(1:1)5 mLではTCPの溶出が見られなかったことから、抽出液をアセトニトリル-水(1:1)溶液として負荷後、同濃度の混液5 mLで洗浄を行うこととした。

図6に示すように、固相抽出カートリッジ処理により、13分以降にみられた巨大な可塑剤のピークはほぼ消滅し、カラムの圧力上昇や保持時間の変化も解消された。さらに、これまでグラジエントによりアセトニトリル100%で巨大なピーク群を溶出していたが、精製後は65%アセトニトリル/水のコンスタントフローのみで測定可能となり、分析時間が短縮でき、ベースラインもより安定した。

#### 7. 添加回収試験

PVCパウダー、PVC製手袋、ラップフィルム、玩具、容器、パイプについて添加回収試験を行った結果、84.7%~92.6%の良好な回収率が得られた(表5)。また、TCP含有PVCシートについて本法を適用したところ、

3 試料のいずれの試行においてもTCP添加量の80%以上の良好な回収が得られ(表6)、本法がPVC中のTCPの分析法として優れていることが示された。

図7に示すように、各試料のHPLCクロマトグラムにおけるTCP保持時間のベースラインは概ね良好であるが、一部の試料で若干のピークが見られることから、定量限界は試料あたり100 ppmとした。

#### D. 結 論

現在のクレゾールリン酸エステル の公定法は、抽出時に有害試薬である四塩化炭素を使用するという問題を抱えており、しかも還流抽出4時間、還流アルカリ分解2時間、その後の液液分配の工程など試験操作が極めて煩雑で、さらに回収率が十分でない、ばらつきが大きいなどの分析精度の問題も指摘されてきた。

今回開発した直接分析法は、極めて簡便であり、しかも回収率や再現性にも優れ、有用性の高い試験法であると考えられる。

#### E. 文献

- 1) 河村葉子、互井千恵子、前原玉枝、山田 隆：食品衛生学雑誌、40、189-197 (1999)
- 2) 河村葉子、六鹿元雄、米谷民雄：平成13年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査—容器包装規格基準等作成報告書(2002)

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
  - 1) 六鹿元雄ら：日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002. 5)