

## 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（TCP）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㈱製、アルドリッチ社製(純度90%以上)、和光純薬工業㈱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㈱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㈱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

n-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 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 東京理化学器械(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 0.1 mm) J&W Scientific社製

カラム温度：50°C-20°C/min-300°C (10 min)

注入口温度：250°C

インレット温度：280°C

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ゲルを充填したもの

移動相：65%アセトニトリル/水

カラム温度：50°C

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°C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