

also has to be considered whether the recycled PET is in direct contact with the foodstuff or separated by a functional barrier. In case of doubt, it must be guaranteed that migration testing is carried out under worst-case conditions.

As an assessment criterion for sufficient cleaning efficiency of the recycling process a maximum migration of 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) is to be applied for the surrogates used. This level must not be exceeded in the migration test including the analytical tolerance (repeatability 'r').

Instead of verification of the assessment criterion by migration testing this requirement can be checked via determination of the residual surrogate content in the regranulate or in the model article, in connection with a scientifically recognised method for migration modelling [2, 4].

A given recycling process shall at least be systematically checked and evaluated once by a challenge test. When the checked process parameters are adhered to, the same cleaning efficiency can be assumed for other equipments constructed in the same way. However, if technical changes to the recycling process are made, it has to be proved that the cleaning efficiency of the recycling process has not deteriorated. This can also be done via a modular test of the respective process step and by means of reduced-scale testing. If necessary, the test should be repeated.

***Guideline II:*** Check the cleaning efficiency of a recycling process by means of a challenge test on the basis of model contaminants (surrogates) introduced artificially in sufficient quantities. Recommended model contaminants are: Toluene, chlorobenzene, phenyl cyclohexane, benzophenone, methyl stearate. For pure-grade re-collected PET, an initial concentration of 500 ppm to 1000 ppm per surrogate is sufficient. For the assessment of the cleaning efficiency, carry out migration testing under suitable testing conditions according to the envisaged use on a model article coming into contact with food which has been manufactured from the contaminated recycling product (recyclate-granulate) resulting from the challenge test. As a result of migration testing, the surrogates used must not exceed a level of 10 ppb [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] including analytical tolerance. This test has to be carried out only once for the same technological process.

#### **Ad III:**

Irrespective of the successful result of the challenge test carried out once, the cleaning efficiency of the recycling process has to be checked by adequate controls. It is therefore recommended to establish an efficient analytical quality assurance in the production process. A suitable approach for example offers gas chromatographical headspace analysis of the incoming raw material and/or the regranulate (finished product) with which migration-relevant foreign compounds in PET, such as organic substances from previous use or misuse can be quantitatively determined [5]. Experience has shown that recycled PET, which has been manufactured from post-consumer PET bottles by modern procedures, can even perform more favourably with regard to components relevant to migration than new material. In any case, on the basis of the analytical result of the quality assurance measures, a recycled product shall not be disadvantageously distinguishable from virgin material.

***Guideline III:*** In addition to the above-mentioned quality assurance criteria (recovery control, cleaning efficiency test and considering conditions of practical use), establish an adequate analytical control of recyclate production.

### **3 Summary**

The legal requirements for commodities are also to be applied to mechanically recycled PET plastics. However, taking account of the possible misuse and, as a rule, inhomogeneous incoming material, additional quality assurance measures are necessary. The incoming material for the mechanical recycling process should be composed of at least 99% of originally food-grade PET. The applied recycling process must be capable to remove from the polymer matrix such migration-relevant substances which could be present from the first use. The necessary cleaning efficiency has to be proved once in a worst-case scenario applying model contaminants (surrogates) and including migration testing and migration assessment, respectively. To control the production process, adequate analytical quality assurance measures are imperative.

### **References**

- [1] Gesundheitliche Beurteilung von Kunststoffen im Lebensmittelverkehr: Stellungnahme der Kunststoffkommission des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin zur Verwendung von Kunststoffergezeugnissen für Mehrweganwendungen und von Kunststoff-Recyclaten für die Herstellung von Lebensmittelbedarfsgegenständen, Bundesgesundheitsblatt, **1995**, 38, 73
- [2] O. Piringer, L. Baner (Editors): Plastic Packaging Materials for Food - Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, Legislation, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**
- [3] F. Welle, R. Franz, Recyclate für den Lebensmittel-Direktkontakt. Bewertung von Recyclingverfahren zur stofflichen Wiederverwertung von Verpackungen, Verpackungs-Rundschau, Technisch-wissenschaftliche Beilage, **1998**, 49, 36-39
- [4] R. Franz, F. Welle, Post-Consumer Poly(ethylene terephthalate) for Direct Food Contact Application - Final Proof of Food Law Compliance, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **1999**, 95, 424-427
- [5] R. Franz, F. Welle, Analytisches Screening und Bewertung von marktüblichen "post-consumer"-PET-Recyclaten für die erneute Anwendung in Lebensmittelverpackungen, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **1999**, 95, 94-100

---

**Memorandum**

July 16, 2001

Division of Food Contact Substance Notification Review  
Chemistry Group 1

Submission dated 4/27/01 (CTS# 75517) from Keller and Heckman: Need for surrogate testing data in the review of tertiary recycling processes for PET.

Division of Petition Review  
Attn: A. Zajac

Keller and Heckman (K&H) has asked whether surrogate testing data is necessary in FDA's review of tertiary recycling processes for polyethylene terephthalate (PET) intended to be used as food packaging, specifically in cases where the PET is depolymerized to its starting monomers. To date, FDA has reviewed surrogate testing data for 9 tertiary recycling processes for polyesters, four of which involve methanolysis of PET or polyethylene naphthalate (PEN) to starting monomers, and five of which involve glycolysis of PET to oligomers. The product monomers or oligomers are then used to manufacture new PET or PEN food containers. The following is our analysis of these combined data.

**METHANOLYSIS TO MONOMERS**

Methanolysis involves dissolving the polyester (PET or PEN) in ethylene glycol (EG) or dimethyl terephthalate (DMT) and reacting the resultant oligomers with methanol to obtain EG and DMT (or 2,6-naphthalenedicarboxylate (DMN) in the case of PEN), which are purified by crystallization and distillation. Since the finished products are the individual monomers, purity can be determined by comparing chromatograms for the recycled monomers with those for commercial, virgin monomers.

The four methanolysis processes we have evaluated are virtually identical in terms of the glycolysis, methanolysis, and purification stages. The submissions for these processes included surrogate testing data obtained by either spiking starting PET or PEN flake with surrogates recommended in our "Points to Consider" or charging the surrogates directly into the methanolysis reactor and then analyzing the finished monomers for the surrogates.<sup>1</sup> The results are given in Table 1 below.

---

<sup>1</sup> The gasoline surrogate used by Hoechst (1991) is not recommended in our "Points to Consider." Hoechst's was one of the first plastics recycling submissions we received from industry and served as the basis for much of the guidance given in the "Points to Consider." In subsequent communications with recyclers, we strongly discouraged the use of gasoline and motor oil as surrogates because of the difficulties in quantifying these complex substances in finished monomers or PET resin and their inherently high detection limits.

**Table 1. Surrogate Concentrations in Monomers Produced from Methanolysis of PET and PEN (values in bold are above the detection limit)**

Company, year of opinion letter	Surrogate	Starting conc. (mg/kg of polyester)	Conc. in finished DMT (µg/kg)	Conc. in finished EG (µg/kg)
Hoechst Celanese 1991 <sup>a</sup>		In PET flake		
	Chlordane	283	< 500	N/A
	Gasoline	--	< 1000	N/A
	Copper acetoarsenite (Cu)	103.5	< 500	N/A
	" (As)	58	< 25	N/A
Eastman Chemical 1991 <sup>b</sup>		Charged to reactor		
	Chloroform	100	< 100	< 100
	Toluene	100	< 100	<b>123</b>
	Diazinon	100	< 100	< 100
	Lindane	100	< 100	< 100
	Cadmium acetate (Cd)	100	< 100	< 100
DuPont 1992 <sup>c</sup>		In PET flake		
	Methylene chloride	1047	< 100	< 100
	Toluene	773	< 100	< 100
	Lindane	969	< 100	< 100
	Copper acetoarsenite (As)	118	< 100	< 100
Eastman Chemical 1996 <sup>d</sup>		In PEN pellets <sup>e</sup>	In finished DMN	
	Chloroform	143	< 16	-- <sup>f</sup>
	Toluene	104	< 14	-- <sup>f</sup>
	Diazinon	119	< 18	-- <sup>f</sup>
	Lindane	101	< 20	-- <sup>f</sup>
	Cadmium acetate (Cd)	130	< 10	-- <sup>f</sup>

<sup>a</sup>FMF 428, memoranda dated 9/12/90 and 11/29/90, M. VanDerveer (HFF-415) to R. White (HFF-335). Hoechst stated that it intended to use only the regenerated DMT.

<sup>b</sup>FMF 490, memorandum dated 7/25/91, M. VanDerveer (HFF-415) to R. White (HFF-335).

<sup>c</sup>FMF 515, memorandum dated 9/10/92, M. VanDerveer (HFF-415) to R. White (HFF-335).

<sup>d</sup>FAP 8B4110, memorandum dated 7/26/93, M. VanDerveer (HFS-247) to R. White (HFS-216).

<sup>e</sup>An additional 100 mg/kg of each surrogate was charged to the reactor.

<sup>f</sup>Chromatograms were provided to show that the finished EG is at least as pure as commercial, virgin material.

In all but one case (toluene in finished EG, Eastman 1991, which was just above the limit of detection (LOD)), the concentration of the surrogate in the finished monomer was below the LOD of the analytical method used. We have determined that a maximum surrogate concentration of 215 µg/kg (ppb) in 20-mil thick PET results in a dietary concentration of 0.5

ppb, FDA's level of no regulatory concern, assuming 100% migration.<sup>2</sup> From Table 1, it is clear that the monomers for each of the recycling processes meet this criterion except for Hoechst's.

For further analysis of Hoechst's values, it should be noted that DMT units comprise 77 wt-% of the finished PET polymer. If we apply this factor to the 215 µg/kg limit, we obtain a maximum allowable surrogate concentration in DMT of 279 µg/kg. Hoechst's values for chlordane and copper exceed this limit by 79%, and for gasoline by a factor of 3.6.

At the time we evaluated Hoechst's process, we had not yet developed our "Points to Consider," and our preliminary work on the Threshold of Regulation concept had established a dietary concentration limit of 1 ppb rather than 0.5 ppb (see the reference cited in footnote a in Table 1 above). Hoechst's values for chlordane and copper meet this higher limit ((279 µg/kg)(2) = 558 µg/kg surrogate allowed in PET). We accepted Hoechst's gasoline level in DMT even though it exceeded what would result in 1 ppb dietary concentration because no residual "gasoline" was actually detected at the LOD of 1 mg/kg, we did not account for any residual gasoline that might be lost during PET fabrication, and we assumed 100% migration of the residual gasoline into food. We can use these same arguments, coupled with surrogate analyses done by Eastman and DuPont at lower LODs for virtually identical methanolysis processes (see Table 1), to conclude that Hoechst's process produces DMT monomer that is suitable for use in manufacturing PET for food contact.

#### GLYCOLYSIS TO OLIGOMERS

Glycolysis involves dissolving the PET in EG to form oligomers such as bis(hydroxyethyl) terephthalate (BHET) and its homologues. The oligomers are then repolymerized with the addition of EG, terephthalic acid, catalysts, and heat. The prepolymer is then solid-stated to increase its molecular weight. Because the final product is PET, a complex polymer, it is difficult to evaluate its purity based on a simple comparison of chromatograms. Surrogate testing has therefore played an important role in our evaluation of PET recycling by glycolysis.

The five glycolysis processes we have evaluated are virtually identical in terms of the glycolysis, prepolymerization, and solid-stating stages. The submissions for these processes included surrogate testing data obtained by either spiking starting PET flake with surrogates recommended in our "Points to Consider" or charging the surrogates directly into the glycolysis reactor and then analyzing the finished PET for the surrogates. The results are given in Table 2 below.

**Table 2. Surrogate Concentrations in Recycled PET Produced by Glycolysis (values in bold are above the detection limit)**

---

<sup>2</sup> T.H. Begley, H.C. Hollifield, "Food Packaging Made from Recycled Polymers" in *Plastics, Rubber and Paper Recycling: A Pragmatic Approach*, 1995, Ch. 36, ACS Symposium Series 609, pages 445-457.

Company, year of opinion letter	Surrogate	Starting conc. (mg/kg of PET)	Conc. in finished PET (µg/kg)	Conc. in Food <sup>a</sup> (µg/kg)
Goodyear 1991 <sup>b</sup>		Charged to reactor		
	Chloroform	200	< 50	
	Toluene	200	< 100	
	Diazinon	100	< 10	
	Lindane	100	< 25	
Hoechst Celanese 1995 <sup>c</sup>		In PET flake		
	Chloroform	1000	< 50	
	Toluene	1000	248	
	Benzophenone	1000	< 200	
	Docosane	1000	< 200	
Wellman 1996 <sup>d</sup>		Charged to reactor		
	Chloroform	1000	< 215	
	Toluene	1000	< 215	
	Benzophenone	1000	< 215	
	Phenyldecane	1000	< 215	
	Calcium mono-methylarsenate (As)	1000	228	< 10
Innovations in PET 1996 <sup>e</sup>		Charged to reactor		
	Chloroform	1000	< 100	
	Toluene	1000	< 100	
	Diazinon	1000	< 100	
	Lindane	1000	50	
	Sodium mono-methylarsonate (As)	1230-1660	210	
Eastman Chemical 1997 <sup>f</sup>		Charged to reactor		
	Chloroform	1000	< 25	
	Toluene	1000	< 50	
	Diazinon	1000	< 20	
	Lindane	1000	69	

<sup>a</sup>Assuming 1 in<sup>2</sup> polymer contacts 10 g food.

<sup>b</sup>FMF 472, memoranda dated 3/12/91, 6/18/91, and 11/22/91, M. VanDerveer (HFF-415) to R. White (HFF-335).

<sup>c</sup>FMF 569, memorandum dated 7/11/95, M. VanDerveer (HFS-247) to R. White (HFS-216).

<sup>d</sup>CTS# 38220 and 38743, memorandum dated 11/28/95, M. VanDerveer (HFS-247) to R. White (HFS-216).

<sup>e</sup>CTS# 39500, memorandum dated 2/5/96, M. VanDerveer (HFS-247) to R. White (HFS-216).

<sup>f</sup>CTS# 48368, memorandum dated 3/31/97, M. VanDerveer (HFS-247) to R. White (HFS-216).

In all but five cases, the concentration of the surrogate in the finished recycled PET was below the LOD of the analytical method used. In three of those five cases, the concentration of the surrogate in finished recycled PET was below 215 µg/kg, the maximum concentration in 20-mil thick PET that results in a dietary concentration of 0.5 ppb, FDA's level of no regulatory concern, assuming 100% migration.<sup>2</sup> In the remaining two cases, toluene in PET (Hoechst 1995) and arsenic in PET (Wellman 1996), the surrogate concentration exceeded the 215 µg/kg limit by 15% and 6%, respectively. These small deviations from the 215 µg/kg limit are well within the uncertainties involved in our exposure calculation, which assumes 100%

migration of the residual surrogate into food. Further, migration tests done by Wellman for Conditions of use C (aqueous/acidic foods) and D (high-alcohol/fatty foods) clearly show that arsenic was not detected in food simulants at an LOD that results in a dietary concentration of 0.5 ppb (see Table 2).

## CONCLUSIONS

Based on the surrogate testing data compiled in Tables 1 and 2, we conclude that tertiary recycling of PET or PEN by methanolysis or glycolysis results in the production of monomers or oligomers that are readily purified to produce a finished polymer that is suitable for food-contact use. Both tertiary processes clean the polyester sufficiently to allow finished food-contact polyester to meet our 0.5 ppb dietary concentration limit, even assuming 100% migration of the residual surrogate to food. In only one case (arsenic in PET, Wellman 1996) did the recycler find it necessary to do migration tests to meet the 0.5 ppb dietary concentration limit. Migration tests were probably not needed in that case because the arsenic level in the PET exceeded the maximum allowed level by only 6%. This is a significant difference from surrogate testing of secondary recycling processes, in which case the PET is generally not cleaned sufficiently to withstand 100% migration calculations for the residual surrogates, and migration tests are required to allow the finished PET to meet our 0.5 ppb dietary concentration limit.

Although we relied on surrogate testing data to come to the conclusion that tertiary recycling of PET or PEN results in finished polymer of suitable purity for food-contact use, we believe that surrogate testing of new tertiary recycling processes for PET or PEN is no longer necessary. As noted previously, each of the methanolysis and each of the glycolysis processes is virtually identical. This is because the same basic physical-chemical processes must occur in order for the desired monomers or finished recycled polyester to be produced. The fact that the 9 processes we have reviewed yield products that consistently meet our 0.5 ppb dietary concentration limit for surrogate contaminants, even assuming 100% migration of the residual surrogates to food, is a strong indication that future tertiary processes will produce products of comparable purity. Of course, tertiary recyclers must continue to ensure that their products are in compliance with the applicable food additive regulations.

Because we have determined that tertiary recycling processes in general produce PET or PEN of suitable purity for food-contact use, we no longer see a need to evaluate these types of processes or to issue individual opinion letters for them. However, we expect that tertiary

recyclers, in future, may still request a letter from FDA. We recommend that you prepare a suitable template, based on this memorandum, for responses to these requests.

Kristina E. Paquette, Ph.D.

HFS-225 (Lin); HFS-245 (Begley); HFS-246 (Kuznesof, RF)

HFS-246:KEPaquette:418-3020:ct75517.doc:kep:7/12/01

Init: PMKuznesof 7/16/01

Final:kep:7/16/01



## 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、アセトニトリルー水（1:1）溶液として固相抽出カラムに負荷し、アセトニトリルー水（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 $100\mu\text{g}$  に対し各種金属  $1,000\mu\text{g}$  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

*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  $\mu$ L

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.  $\times$  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.  $\times$  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°C

注入量：20  $\mu$ L

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

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)及びフタル酸ジイソノニル(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め、分析時間も長かかった。

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)

表1. 各種カラムによるTCP異性体の保持時間の比較

カラムの種類	移動相	保持時間 (min)			
		標準品	<i>o, o, o</i> -TCP	<i>m, m, m</i> -TCP	<i>p, p, p</i> -TCP
Inertsil Ph-3	65% CH <sub>3</sub> CN/水	9.3	9.3	9.4	9.2
TSKgel Octyl-80Ts	55% CH <sub>3</sub> CN/水	11.0	11.3	11.1	10.9
TSKgel ODS-80Ts	80% CH <sub>3</sub> CN/水	10.7	11.5	10.5	10.7

カラムサイズ : 4.6 mm×250 mm, 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 50°C, 注入量 : 20 μL

表2. 主な異性体の検出感度の比較

	標準品	<i>o, o, o</i> -TCP	<i>m, m, m</i> -TCP	<i>p, p, p</i> -TCP
ピーク面積	20,400 (1.00)	17,800 (0.87)	17,200 (0.85)	24,900 (1.22)
ピーク高さ	1,010 (1.00)	930 (0.91)	890 (0.88)	1,290 (1.27)

TCP : 10 ppm

表3. ポリ塩化ビニル製品からの抽出率

	含有量 (ppm)	抽出率 (%)	
		アセトン-ヘキサン (3:7)	アセトニトリル
手袋	(1,000)	91.9	100.2
ラップフィルム	(1,000)	82.3	97.3
シート1	31,000	81.9	89.3
シート2	61,000	82.5	88.7
シート3	88,000	82.6	89.8

手袋、ラップフィルム : 細切後、TCP アセトン溶液を添加



表4. 各種固相抽出カートリッジによるTCP、DEHP及びDINPの溶出率

カートリッジの種類	溶出溶媒 (CH <sub>3</sub> CN : 水)	溶出率 (%)		
		TCP	DEHP	DINP
Sep Pak C18	1 : 1	5.5	0.0	0.0
	2 : 1	97.6	0.4	0.4
	7 : 3	94.3	4.4	0.5
OASIS HLB	1 : 1	64.7	6.6	0.0
	3 : 2	81.5	24.7	0.4
	2 : 1	95.3	61.2	31.6
GL-Pak PLS-2	7 : 3	79.4	3.3	1.4
	3 : 1	81.2	13.9	5.6
	4 : 1	90.7	40.0	16.7

表5. ポリ塩化ビニル製品を用いた添加試験でのTCPの回収率

	PVC パウダー	手袋	ラップ フィルム	玩具	容器	パイプ
回収率(%)	84.7	90.6	89.6	92.5	92.6	86.7
S. D.	3.9	0.1	3.7	5.0	1.3	7.9

表6. TCP含有ポリ塩化ビニル製品でのTCPの回収率

	シート1	シート2	シート3
含有量(ppm)	31,000	61,000	88,000
回収率(%)	82.0	84.8	82.0
S. D.	0.8	0.5	1.7

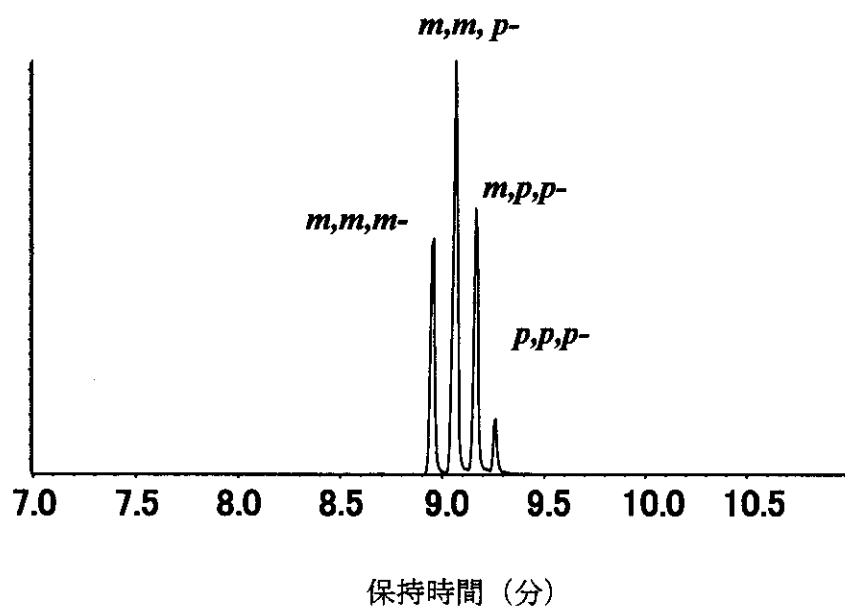


図1 クレゾールリン酸エステル (標準品) のGC/MS/トータルイオンクロマトグラム

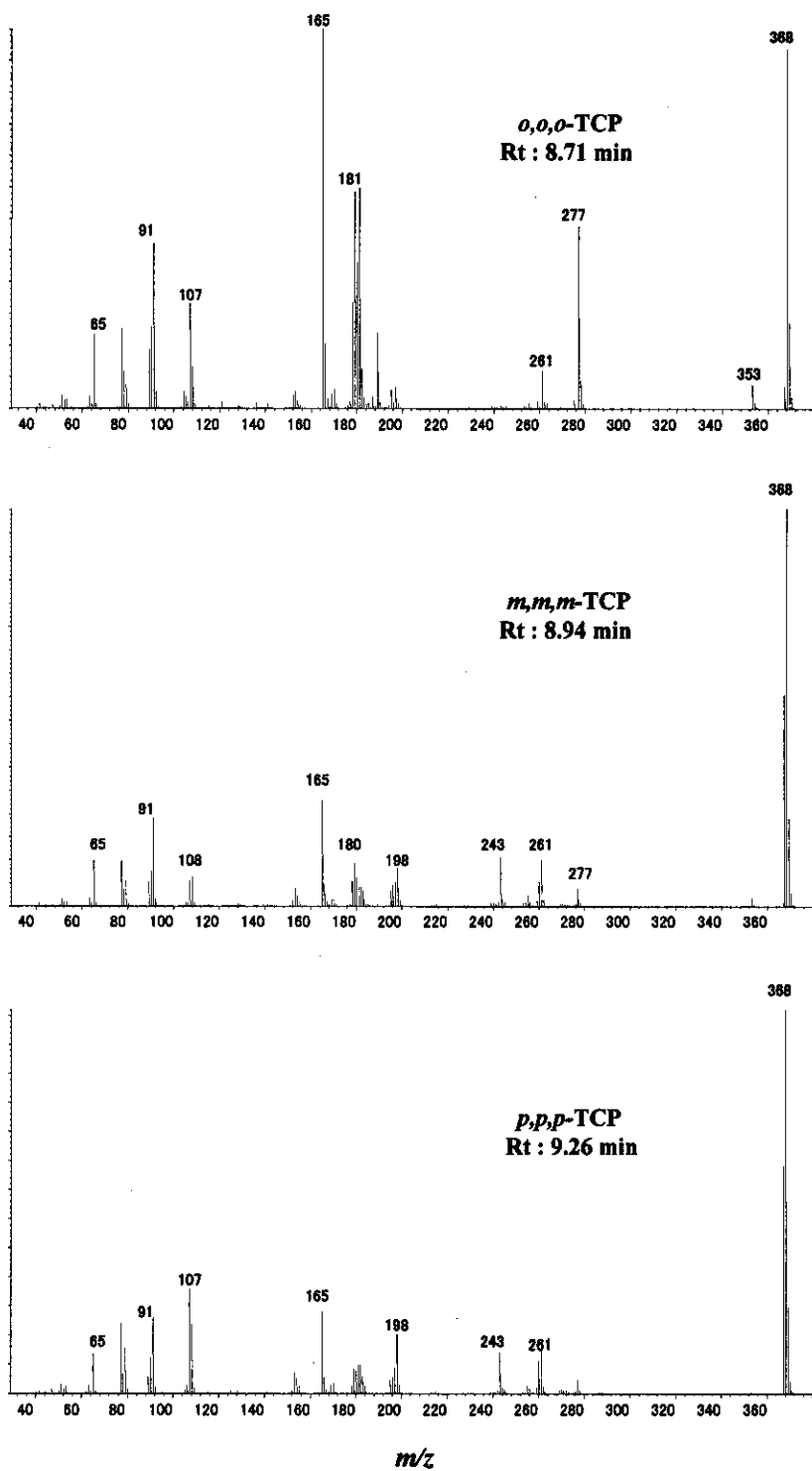


図2 *o,o,o*、*m,m,m*、*p,p,p*-クレゾールリン酸エステル  
保持時間及びマススペクトル

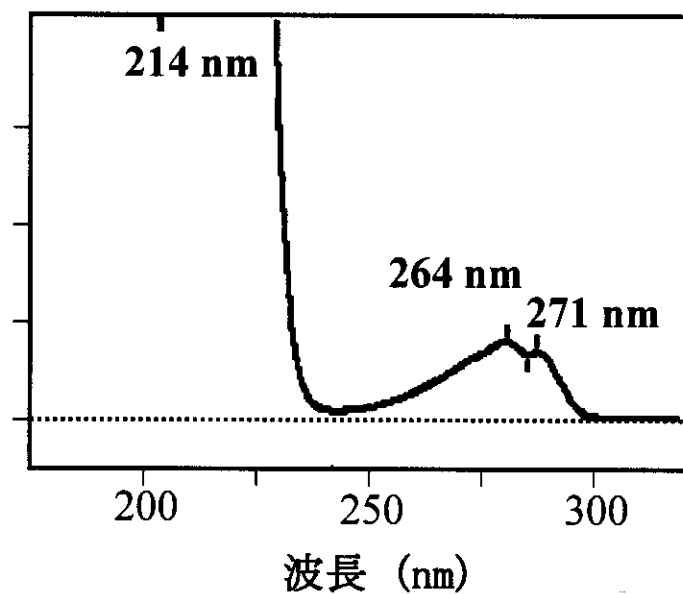


図3 クレゾールリン酸エステル標準品のUVスペクトル

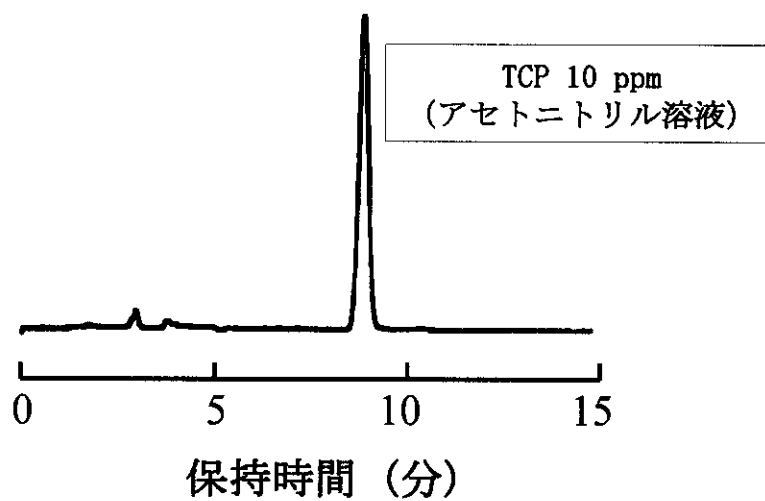


図4 Inertsil Ph-3カラムによるクレゾールリン酸エステル標準品のクロマトグラム