

表7. 8の字振とう及び往復振とうにおける歯がため試験片からの  
DINPの溶出

振とう方法	振とう回数 (回/分)	DINP ( $\mu\text{g/mL}$ )				
			ビー玉無し		ビー玉3個	
8の字振とう 振幅15x24 mm 1時間, 37°C	90	A	3.0		3.1	
		B	1.1	1.7 $\pm$ 1.8	5.9	4.7 $\pm$ 1.4
		C	1.1		5.1	
	80	A	0.3		0.4	
		B	0.5	0.4 $\pm$ 0.1	4.4	2.7 $\pm$ 2.1
		C	0.5		3.2	
往復振とう 振幅24 mm 1時間, 37°C	160	A	0.3		0.1	
		B	0.3	0.3 $\pm$ 0.1	0.6	0.4 $\pm$ 0.3
		C	0.2		0.4	
上下振とう 振幅40 mm 15分間, 20°C	300	A	6.6			
		B	3.2	6.2 $\pm$ 2.9		
		C	8.9			

試料：歯がため試験片（表面積15cm<sup>2</sup>，重量2.83 $\pm$ 0.29g）

溶出条件：人工唾液30 mLで溶出

8の字振とう及び往復振とうは100 mL容の三角フラスコ（底辺66 mm），上下振とうは50 mL容のガラス製蓋付き遠心管を用いた。

表 8 . 上下振とう15分間繰り返しによるおしゃぶり, ガラガラ及び  
歯がためからのDINPの溶出

	DINP 溶出量 (mean±S.D., n=3, C.V.)					
	おしゃぶり		ガラガラ		歯がため	
	μg/mL	%	μg/mL	%	μg/mL	%
15分 1回	9.9±0.4	3.5	8.2±0.5	6.0	6.2±2.9	46
2	8.1±0.5	6.0	7.9±0.4	4.4	6.0±2.1	35
3	5.0±0.4	7.0	6.6±0.6	9.3	5.8±1.6	27
4	4.6±0.7	14	5.7±0.4	6.6	5.4±1.6	29

試料：おしゃぶり, ガラガラ及び歯がため試験片はいずれも表面積15cm<sup>2</sup>  
溶出条件：50 mL容量のガラス製蓋付き遠心管に人工唾液30 mLを入れ溶出

表 9 . 上下振とう(300回/分)の1時間連続振とう及び  
15分間振とうの繰り返しによるDINPの溶出量の比較

試料	DINP 溶出量 (μg/mL)	
	1時間連続	15分間 x 4回
おしゃぶり	35.8 ± 4.0	27.6 ± 1.1
ガラガラ	28.6 ± 3.4	28.5 ± 1.6
歯がため	19.2 ± 4.6	23.4 ± 8.1

試料：おしゃぶり, ガラガラ及び歯がため試験片はいずれも  
表面積15cm<sup>2</sup>  
溶出条件：50 mL容量のガラス製蓋付き遠心管に人工唾液30 mL  
を入れ溶出

表10. 人工唾液pHのDINP溶出に及ぼす影響

		DINP 溶出量 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		pH 2.5	pH 4.5	pH 6.8
おしゃぶり 8の字振とう(80回)	ビー玉3個	8.4 $\pm$ 2.0	29.8 $\pm$ 6.4	13.5 $\pm$ 2.2
	無し	6.2 $\pm$ 0.9	22.9 $\pm$ 4.5	24.8 $\pm$ 2.9
おしゃぶり 上下振とう(300回)	15分-1回	9.9 $\pm$ 0.4	11.3 $\pm$ 0.7	9.4 $\pm$ 3.1
	2	8.1 $\pm$ 0.5	9.6 $\pm$ 0.9	8.5 $\pm$ 2.5
ガラガラ 上下振とう(300回)	15分-1回	8.2 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.6	6.9 $\pm$ 1.0
	2	7.9 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 1.0

表11. その他のおもちゃ試料からの300回/分上下振とう及び90回/分  
8の字振とうによるDINPの溶出量

試料		DINP 溶出量 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		上下振とう (15分間)		8の字振とう (90回1時間)
		1回	2回	
トマト	34%	13.7 $\pm$ 3.0	10.7 $\pm$ 1.7	18.2 $\pm$ 8.3
リンゴ	33	8.1 $\pm$ 1.8	6.6 $\pm$ 1.3	8.8 $\pm$ 3.9
ままごと道具J	37	12.5 $\pm$ 1.0	9.7 $\pm$ 1.8	8.5 $\pm$ 3.0
ソフトドールC	16	3.2 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.9
	E 26	10.1 $\pm$ 0.9	9.0 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 1.4
	O 29	7.7 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 3.4

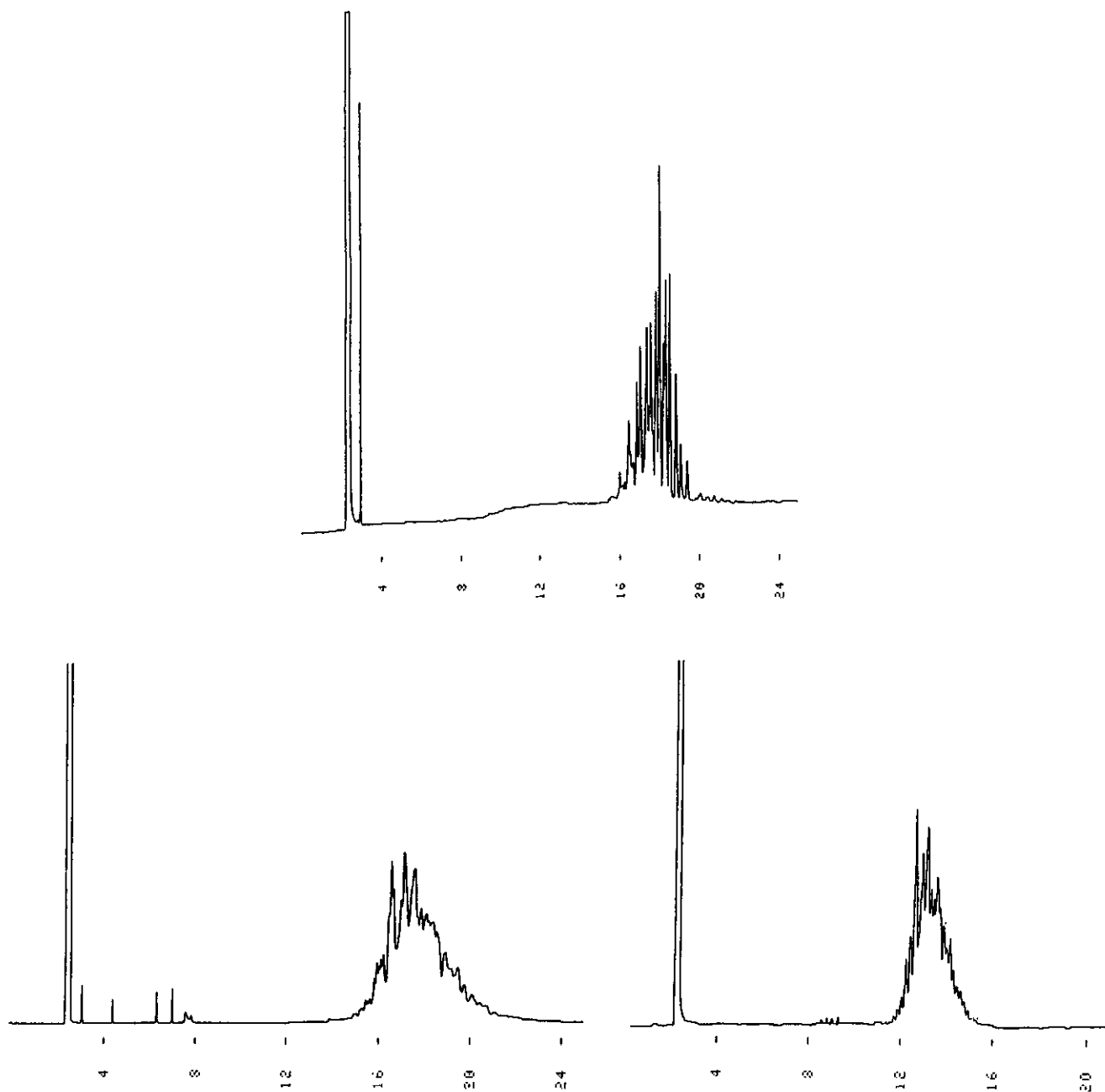


図 1. DINPのGCクロマトグラム

A : 和光純薬工業製試薬 (1000  $\mu$ g/mL) カラム温度①

B : 関東化学製試薬 (1000  $\mu$ g/mL) カラム温度①

C : 関東化学製試薬 (1000  $\mu$ g/mL) カラム温度②

GC条件

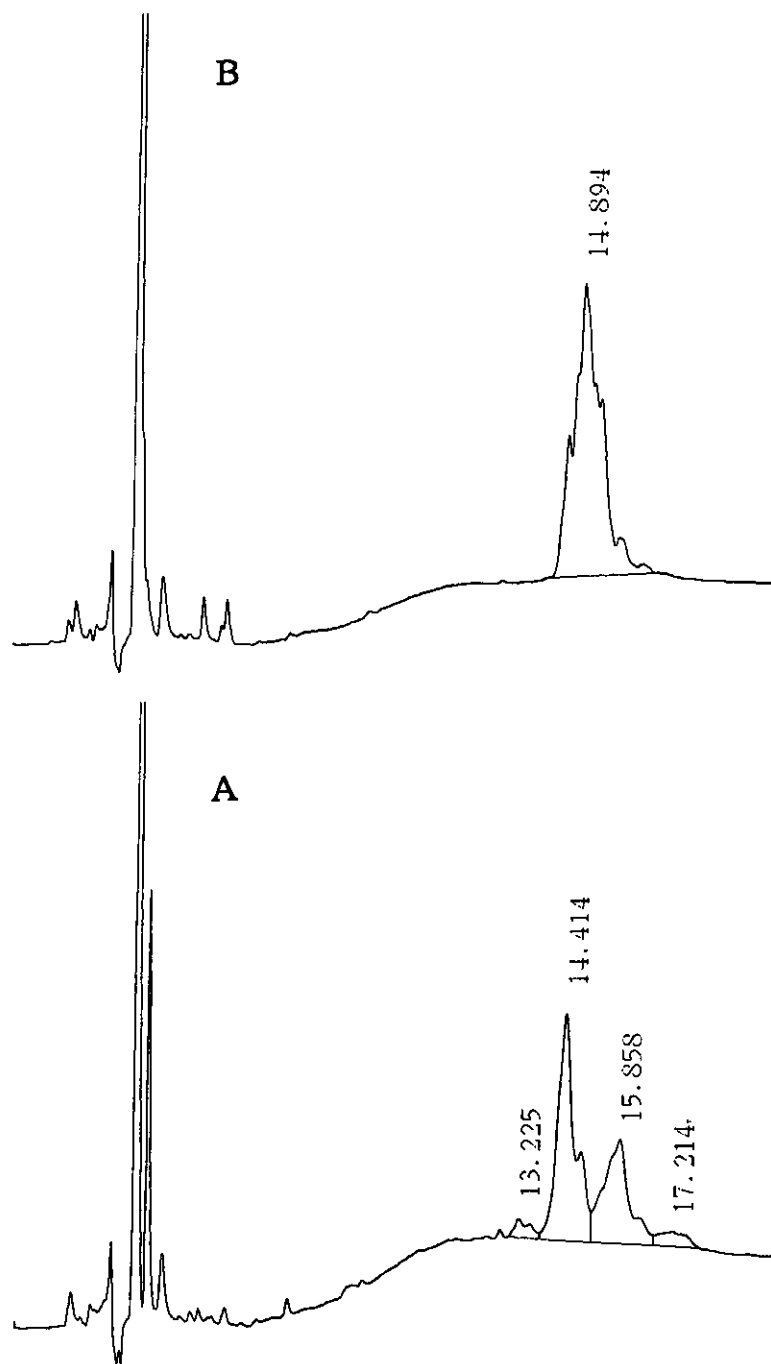
カラム : DB-1 (0.25 mm x 30 m, 膜厚0.25  $\mu$ m)

注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C, 検出器温度 : 300 $^{\circ}$ C

カラム温度 : ①100 $^{\circ}$ C (1 min)-40 $^{\circ}$ C/min- 220 $^{\circ}$ C (0 min)-10 $^{\circ}$ C/min-  
280 $^{\circ}$ C (15 min)

②200 $^{\circ}$ C (1 min)-10 $^{\circ}$ C/min- 300 $^{\circ}$ C (10 min)

注入量 : 1  $\mu$ l, スプリット (25:1)



## 図 2. DINPのHPLCクロマトグラム

A : 和光純薬工業製試薬 (2  $\mu$ g/mL)

B : 関東化学製試薬 (2  $\mu$ g/mL)

HPLC条件

カラム : TSKgel ODS-80Ts QA (4.6 mm x 250 mm)

カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 225 nm

移動相 : アセトニトリル-水 (9 : 1) から, リニアグラジエント 5 分で  
アセトニトリル 100% とし, 15 分間保持した.

注入量 : 50  $\mu$ l

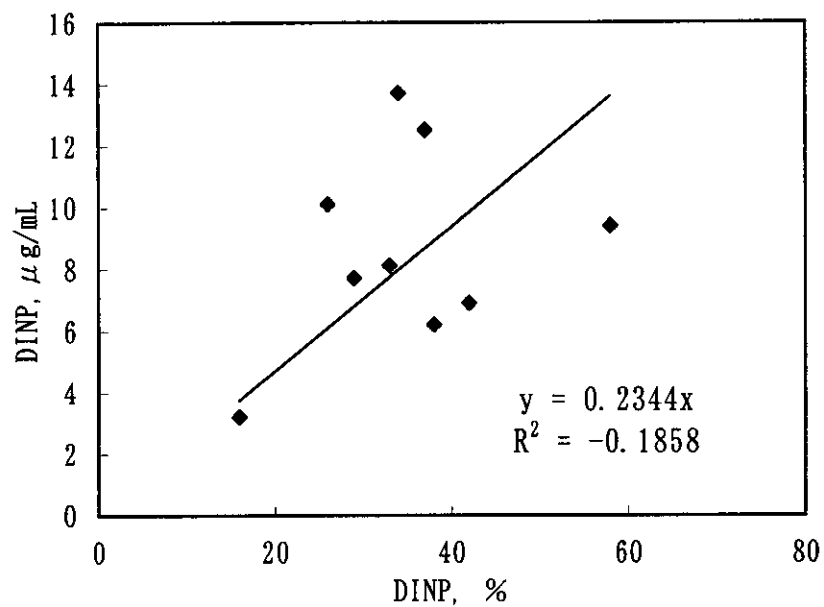


図 3 . DINPの材質中残存量と溶出量

溶出試験：試験片 $15\text{cm}^2$ を $50\text{ mL}$ 容量のガラス製蓋つき遠心管に入れ、人工唾液 $30\text{ mL}$ を加えて、上下振とう( $300\text{回/分}$ )を $15\text{分間}$ 行った。

## おもちゃからのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究

協力研究者 石橋 亨

新野竜大(共同研究者)

加藤文秋(共同研究者)

所属 財団法人 東京顕微鏡院

### 研究要旨

フタル酸エステル(DEP, DPP, DBP, BBP, DPeP, DCHP, DHpP, DEHP, DOP, DNP および DINP)の11種とアジピン酸エステル DEHA あわせて12種のGCとGC-MSおよびHPLCによる一斉分析法を確立した。GC分析は昇温分析,そしてGC-MS分析を同条件で行ない,それぞれのフタル酸エステルから共通のフラグメントイオン  $m/e149$  が, DEHA から  $m/e129$  が得られ, 定量用イオンとすることができた。また, HPLC分析はグラジエント溶出法を用いた。本法を用いて市販おもちゃ18種を分析したところ, ポリ塩化ビニル(PVC)製品からフタル酸エステル DBP, DEHP, DEHA, DNP および DINP の5種が検出され, その含有量は0.2%~58.3%であった。材質がPVC製以外のものからは検出されなかった。

人工唾液の溶出試験ではDINPを含有するおもちゃを用いた。上下振とうによる溶出と左右振とうによる溶出,それぞれにおけるDINPの溶出量は,その振とう回数に影響されることが分かった。300回/分の上下振とうおよび120回/分の左右振とう,振幅40mmでの溶出において,15分間ずつの溶出時間での溶出量がそれぞれ一定であった。また60分間の総溶出量は,上下振とう溶出が左右振とう溶出より約2倍多かった。

また, PVC製おもちゃ8種の上下振とうおよび左右振とうそれぞれの溶出法によるフタル酸エステルの溶出量は,おもちゃ中の含有量が1%以下では溶出量は $4\mu\text{g}$ 以下であり,1%以上では全てのおもちゃからフタル酸エステルが溶出した。その量は上下振とう溶出で $130\mu\text{g}\sim1583\mu\text{g}$ ,左右振とう溶出で $149\mu\text{g}\sim697\mu\text{g}$ であり,左右振とう溶出より,上下振とう溶出による溶出量のほうが多かった。

ヒトの口腔内における唾液の溶出移行試験は, DINPを含有するPVC製おもちゃ3試験品をヒト口腔内で軽くchewingし, DINPの唾液への溶出移行量をみた。被験者は男性3人と女性1人の合計4人で,15分間chewingし5分間休む,このchewing行程を4回行ない,計60分間の総DINP溶出移行量をHPLC測定した。被験者それぞれのDINPの溶出移行量はほぼ一定値を示した。その平均溶出移行量は,試験品「おしゃぶり(DINP含有量58.3%)」が $300\mu\text{g}$ ,「歯がため(DINP含有量35.9%)」が $182\mu\text{g}$ および「ガラガラ-A(DINP含有量31.9%)」が $341\mu\text{g}$ であった。

## はじめに

外因性内分泌攪乱化学物質いわゆる『環境ホルモン』はわれわれ人間の生活環境に広く存在していて、人間あるいは野生動物がこれらの化学物質を生体内に取り込んだとき、生体本来の正常なホルモン作用を攪乱、生殖機能の阻害あるいはガン発生などを引き起こす可能性が指摘され、世界的に大きな問題となっている。

とくに、胎児あるいは乳幼児などがこれらの化学物質に汚染されると、成長するに従って種々の障害が発生してしまう可能性が考えられ、早期の研究が期待されている。

このような背景から、乳幼児が使用のおもちゃあるいは食器等から、内分泌攪乱物質のひとつとして疑われているフタル酸エステルの溶出に関する調査研究として、ポリ塩化ビニル(PVC)の可塑剤として使用され、PVC製の乳幼児用おもちゃに含有するフタル酸エステルの種類とその含有量、人工唾液によるその溶出量、そしてヒト唾液中への移行量について試験研究を行った。その結果

I, おもちゃのフタル酸エステルの分析法とその含有量

II, おもちゃからのフタル酸エステルの人工唾液による溶出条件の検討

III, おもちゃからのフタル酸ジイソノニルの人工唾液とヒト唾液への移行-溶出それぞれについて報告する。

## I. おもちゃのフタル酸エステルの分析法とその含有量

### 1-まえがき

ポリ塩化ビニル(PVC)製おもちゃに含まれるフタル酸エステルのガスクロマトグラフ(GC)分析、ガスクロマトグラフ質量(GC-MS)分析、高速液体クロマトグラフ(HPLC)分析それぞれの分析条件の検討を行なった。そして、得られた分析条件にて、おもちゃ 18 種類中のフタル酸エステルの種類とその含有量を測定した。

### 2- 実験方法

#### 試薬および器具

標準試薬としてのフタル酸エステル類及びアジピン酸エステルは以下のものを用いた。

- 1) フタル酸ジエチル(DEP)
- 2) フタル酸ジプロピル(DPP)
- 3) フタル酸ジブチル(DBP)
- 4) フタル酸ブチルベンジル(BBP)
- 5) フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)
- 6) フタル酸ジ 2-エチルヘキシル(DEHP)
- 7) フタル酸ジオクチル(DOP)
- 8) フタル酸ジノニル(DNP)
- 9) フタル酸ジイソノニル(DINP)
- 10) フタル酸ジペンチル(DPeP)
- 11) フタル酸ジヘプチル(DHpP)
- 12) アジピン酸ジ 2-エチルヘキシ(DEHA)

上記 12 種類のうち DINP は関東化学社、和光純薬社および Aldrich 社製の 3 種類を、DPeP, DNP は和光純薬社製、その他は関東化学社製を使用した。

n-ヘキサン(残留農薬試験用, 和光純薬社製)



アセトニトリル(HPLC 試験用, 和光純薬社製)

フタル酸エステル標準溶液: 実験には DINP 標準溶液と, その他 11 種のフタル酸エステル(DEHA 含む)混合標準溶液の 2 種を用いた. DINP およびその他 11 種の各標準試薬を 100mg 正確にはかり n-ヘキサン 100mL で混合したものを, GC 分析用フタル酸エステル標準液原液(1mg/mL)とし, また同様にはかりとった標準試薬をアセトニトリル 100mL で混合したものを HPLC 分析用フタル酸エステル標準液原液(1mg/mL)とした. 各標準原液は n-ヘキサンまたはアセトニトリルで希釈し, 各種濃度の標準溶液とした.

塩化ナトリウム(残留農薬試験用, 関東化学社製)

無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用, 関東化学社製)

本実験に用いた試薬は全てフタル酸エステルが含まれないことを確かめた. また, 実験に使用したガラス器具類は, 使用前に 210°C で 5 時間以上加熱処理した.

## 装置

振とう数可変装置付振とう機: RECIPRO SHAKER, SR-II W, タイテック社製

振とう数可変装置付振とう培養器: UNI THERMOSHAKE, NTS-2000, EYELA 社製

FID 検出器付ガスクロマトグラフ(GC): GC-17A, 島津製作所社製

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS): GCMS5050, 島津製作所社製

UV 検出器付高速液体クロマトグラフィー(HPLC): LC-10, 島津製作所社製

GC 用カラム: HP-1(30m×0.25mmi. d., 0.25 μm)

GC-MS 用カラム: CBP-5(50m×0.25mmi. d., 0.25 μm)

HPLC 用カラム: Inertsil C8-3(4.6×250mm)

## 試験用おもちゃの種類

- 1) がらがら -A
- 2) 歯がため
- 3) おしゃぶり
- 4) ボール -A
- 5) ボール -B
- 6) ボール -D
- 7) ボール -E
- 8) ままごと道具 -G~-I
- 9) ストロー -C
- 10) ストロー -D
- 11) ソフトドール -V
- 12) チャイム
- 13) ラップ
- 14) ストロー -B
- 15) 指遊び
- 16) ビーチボール
- 17) キッチンセット
- 18) ままごとセット

以上 18 種類.

## 材質試験(おもちゃに含まれるフタル酸エステルの種類とその含有量試験)

抽出溶媒は n-ヘキサンまたはアセトニトリルを用い, 試験品を約 1mm 角に切断したのち, 正確に 1g を 100mL 容トルビーカーにとり, n-ヘキサンまたはアセトニトリル 50mL を入れ, 37°C に加温しながら一昼夜, 試験品中のフタル酸エステルを抽出した. その抽出液を濾過して試験品を取り除き, n-ヘキサンまたはアセトニトリルでそれぞれ 100mL に定容した.

n-ヘキサン抽出液を GC, GC-MS 測定用試験液, アセトニトリル抽出液を HPLC 測定用試験液とした。

#### フタル酸エステルの分析

##### GC の分析条件

カラム : HP-1 (30m×0.25mmi. d., 0.25 μm)

カラム温度 :

初期温度 50℃ (2 分保持) → 昇温 40℃/分 → 220℃ (0 分) → 昇温 10℃/分 → 最終温度 270℃

注入口温度 : 290℃

検出器温度 : 270℃

##### GC-MS の分析条件

###### GC 部

カラム : CBP-5 (50m×0.25mmi. d., 0.25 μm)

または HP-1 (30m×0.25mmi. d., 0.25 μm)

カラム温度 :

カラムが CBP-5 初期温度 100℃ (1 分) → 昇温 20℃/分 → 最終温度 280℃

カラムが HP-1 初期温度 50℃ (2 分保持) → 昇温 40℃/分 → 220℃ (0 分) → 昇温 10℃/分 → 最終温度 270℃

注入口温度 : 290℃

インターフェイス温度 : 290℃

###### MS 部

イオン源温度 : 290℃

検出モード : SIM

##### HPLC の条件

カラム : Inertsil C8-3 (4.6×250mm)

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトニトリル・水 (70%アセトニトリル → 100%アセトニトリル (15分))

流速 : 1.0mL/min.

検出器 : UV 測定波長 225nm

#### 測定

材質試験で得られた試験液を, 上記した GC, GC-MS および HPLC それぞれの分析条件でフタル酸エステルの定性, 定量を行った。

また, フタル酸エステルの確認は GC-MS で行った。確認に用いたフタル酸エステルそれぞれのフラグメントイオン(m/e)は以下の通りである。

測定用質量イオン(m/e) : 149(フタル酸エステル), 129(アジピン酸エステル),  
確認用イオン(m/e) :

DEP : 177, DPP : 209, DBP : 223, BBP : 206,  
DPeP : 237, DCHP : 167, DEHP : 167,  
DHpP : 70, DOP : 167, DNP : 167, DINP : 293,  
DEHA : 147,

### 3- 実験結果および考察

#### GC 分析条件の検討

フタル酸エステルは高沸点化合物であるため, 本実験に用いた 12 種のエステルの一斉分析は昇温分析で, 分析カラムはキャピラリーカラムでジメチルポリシロキサンを液相とする HP-1 (30m) を用いた。

その分析条件は, 初期温度 50℃, 2 分保持, 昇温は 40℃/分で 220℃, その後直ちに 10℃/分で最終温度 280℃とした。これにより, DINP を除く 11 種類の DEHA を含むフタル酸エステルの一斉同時分析が可能となった。その GC 分析のクロマトグラムを 図 I-1 に示した。また, DINP は多数の異性体が存在し, GC のガスクロマトグラフにピークが多数出現した (図 I-2)。しかし, これらのピークは分離が良好でなく, その分離を改善するため種々分析条件を検討したが, 良好な結

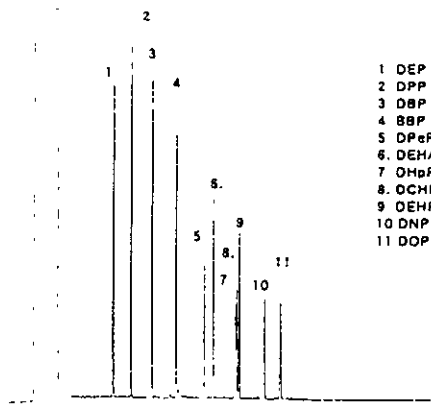


図-1-1 フタル酸エステル・DEHAを含むのGCクロマトグラム  
フタル酸エステル 各々100ppm

DEP フタル酸ジエチル DPP フタル酸ジプロピル DBP フタル酸ジブチル DPeP フタル酸ジペンチル  
BBP フタル酸ジベンジル DEHA アジピン酸 2-エチルヘキシル DHpP フタル酸ジヘプチル  
DCHP フタル酸シクロヘキシル DEHP フタル酸 2-エチルヘキシル DNP フタル酸シノニル  
DOP フタル酸ジオクタチル

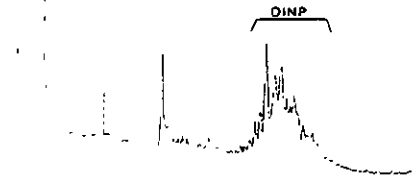


図-1-2 フタル酸ジシノニル(D1NP)のGCクロマトグラム  
フタル酸ジシノニル 各々100ppm

D1NP フタル酸ジシノニル

果は得られなかった。

### GC-MS 分析条件の検討

GC分析で得られた分析条件で、DEHAを含むフタル酸エステルのGC-MS分析を行った。得られたそれぞれのマススペクトログラムのうち、今回調査研究を行なったおもちゃ製品の材質中から確認されたフタル酸エステルのマススペクトログラムを図I-3~6に示した。

本実験において使用したフタル酸エステルのマススペクトログラムから m/e149, そしてDEHAはm/e129それぞれのフラグメント

イオンが得られた。これをフタル酸エステルのGC-MS定量用イオンとし、また確認用のフラグメントイオンを、DEPはm/e177, DPPは209, DBP223, BBP206, DPeP237, DCHP167, DEHP167, DHpP70, DOP167, DNP167, D1NP293,そしてDEHAはm/e147とし、SIM分析モードでDEHAを含む12種のフタル酸エステルの同時定量分析が可能となった。

### HPLC 分析条件の検討

11種のフタル酸エステル(DEHAを除く)のHPLC分析に、移動相としてアセトニトリル-水混合液を用い、検出波長を225nmで検

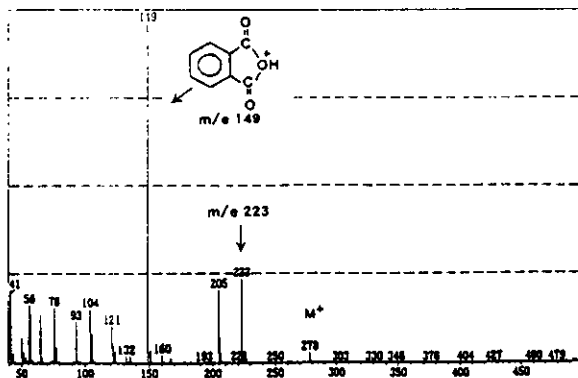
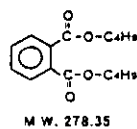


図-1-3 フタル酸ジブチルのマススペクトログラム

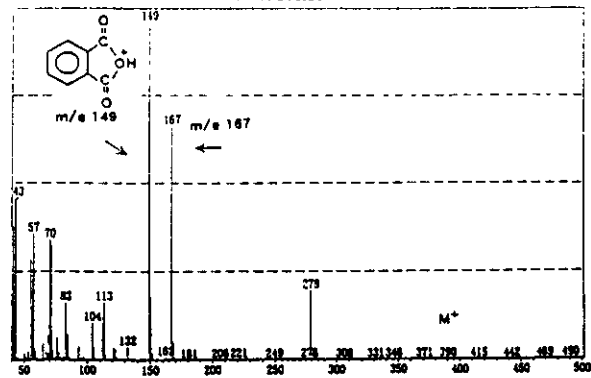
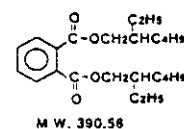


図-1-4 フタル酸 2-エチルヘキシルのマススペクトログラム

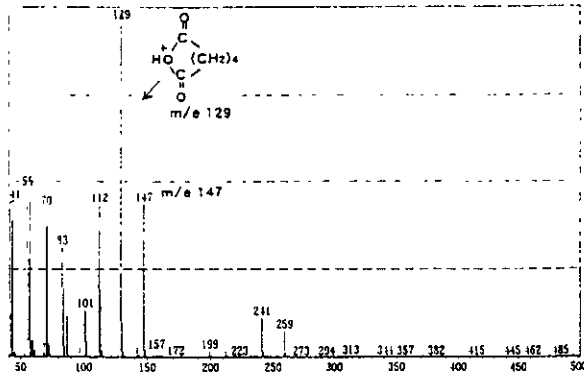
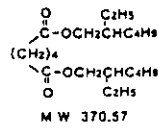


図-1-5 アジピン酸ジ2-エチルヘキシルのマススペクトログラム

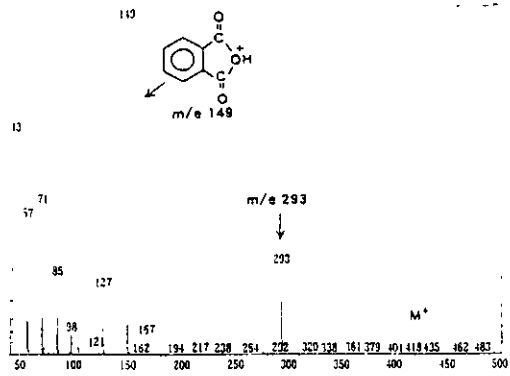
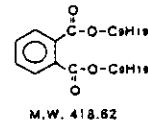


図-1-6 フタル酸ジイソニルのマススペクトログラム

討を行った。アセトニトリル 100%で 10 種のフタル酸エステルおよび DINP を分析したが、10 種それぞれのフタル酸エステルの分離は良好でなかった。そのとき得られた HPLC クロマトグラムを 図 I-7 に示した。

そこで、アセトニトリル 70%からのグラジエント分析を行なったところ、DINP を除いた 10 種のフタル酸エステルの一斉分析が可能となった。そのフタル酸エステルと DINP の HPLC クロマトグラムを 図 I-8 にそれぞれ示した。また DINP は GC 分析のときと同様、数種の異性体によるピークが数本出現した。

この DINP の保持時間は一斉分析で最後にピークが出現する DNP の保持時間と近似し、これらを生離するため種々の移動相を検討したが、これらの分離を同時に分析することは困難であった。

### おもちゃの材質試験

おもちゃ 18 種類について、フタル酸エステルの種類とその含有量を GC 分析、HPLC 分析および GC-MS により測定した。その結果を表 I-1-1~2 に示した。

それぞれのおもちゃの材質を赤外線吸収

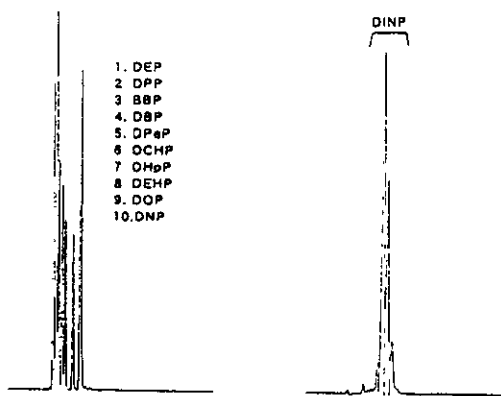


図-1-7 移動相をアセトニトリル 100%で分析したときのフタル酸エステルの HPLC クロマトグラム

- 1) 移動相: 100%アセトニトリル
  - 2) DEP, DPP, DBP, DPeP, BBP, DBP, DPeP, DNP, DOP 各 100ppm の HPLC クロマトグラム (一斉分析)
  - 3) DINP 100ppm の HPLC クロマトグラム
- DEP: フタル酸ジエチル, DPP: フタル酸ジプロピル, DBP: フタル酸ジブチル, DPeP: フタル酸ジペンチル, DNP: フタル酸ジノニル,  
BBP: フタル酸ブチルベンジル, DBP: フタル酸ジシクロヘキシル, DPeP: フタル酸ジ2-エチルヘキシル, DNP: フタル酸ジノニル,  
DOP: フタル酸ジオクタール, DINP: フタル酸ジイソニル

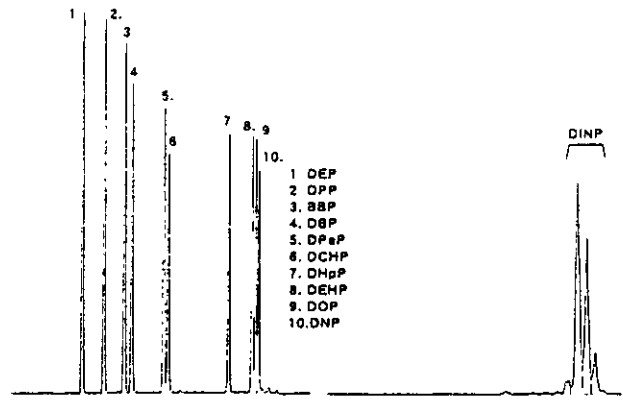


図-1-8 移動相をアセトニトリル 70%から 100%でグラジエント分析したときのフタル酸エステルの HPLC クロマトグラム

- 1) 移動相: アセトニトリル 70%~100%のグラジエント
  - 2) DEP, DPP, DBP, DPeP, BBP, DBP, DPeP, DNP, DOP 各 100ppm の HPLC クロマトグラム (一斉分析)
  - 3) DINP 100ppm の HPLC クロマトグラム
- DEP: フタル酸ジエチル, DPP: フタル酸ジプロピル, DBP: フタル酸ジブチル, DPeP: フタル酸ジペンチル, DNP: フタル酸ジノニル,  
BBP: フタル酸ブチルベンジル, DBP: フタル酸ジシクロヘキシル, DPeP: フタル酸ジ2-エチルヘキシル, DNP: フタル酸ジノニル,  
DOP: フタル酸ジオクタール, DINP: フタル酸ジイソニル

スペクトル法により鑑別した。その結果、「がらがら-A」からは顔面部分がポリ塩化ビニル(PVC)製であった。同様に、「歯がため」は歯がため部分が PVC, 「おしゃぶり」はおしゃぶり部分が PVC, 「ボール-A」は全て PVC, 「ボール-B」, 「ボール-D」, 「ボール-E」, 「ビーチボール」も全て PVC 製, そして, 3

種類の「ままごと道具」も全体が PVC 製であった。「ストロー-A」, 「ストロー-C」はストロー部分が, 「ストロー-D」はトレー部分とストロー部分がそれぞれ PVC, 「チャイム」は本体表面部分が PVC 製であった。「ラッパ」と「指遊び」は PVC 製部分が存在しなかった。「キッチンセット」は目玉焼き部分が,

表 I1-1 ポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステルの含有量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル (%)				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
がらがら A	顔面	PVC	-	-	-	-	31.9
	胴体 握り	ABS	-	-	-	-	-
歯がため	歯がため	PVC	-	-	-	-	35.9
	リング	PE	-	-	-	-	-
	人形	ABS	-	-	-	-	-
おしゃぶり	おしゃぶり	PVC	-	-	-	-	58.3
	ミッキー	ABS	-	-	-	-	-
ボール A	黄色部	PVC	11.2	15.9	0.9	-	-
	桃色部	PVC	12.2	15.1	0.6	-	-
	緑色部	PVC	12.0	14.9	1.1	-	-
ボール B	青色部	PVC	10.2	19.5	1.2	-	-
	黄色部	PVC	10.7	19.6	1.0	-	-
	赤色部	PVC	10.0	18.5	1.5	-	-
	白色部	PVC	9.8	19.2	1.2	-	-
ボール D	黄色透明部	PVC	21.7	36.9	-	-	-
	青色透明部	PVC	22.3	39.1	-	-	-
	赤色透明部	PVC	21.8	35.5	-	-	-
ボール E		PVC	-	-	-	-	25.7
ままごと道具 G	グリフアード	PVC	0.3	-	-	-	39.7
ままごと道具 I	お子様ランチ	PVC	8.3	-	-	-	29.2
ままごと道具 H	おにぎり	PVC	5.2	-	-	-	26.4
ストロー C	ストロー	PVC	-	0.8	-	-	-
	その他	PE	-	-	-	-	-
ストロー D	トレー	PVC	-	1.0	-	-	-
	ストロー (1)	PE	-	-	-	-	-
	ストロー (2)	PVC	-	0.5	-	-	-
ソフトドール V		PVC	-	20.1	-	3.4	-
チャイム	握り	PS	-	-	-	-	-
	本体表面	PVC	-	0.2	-	-	-

材質の略語

PVC ; ポリ塩化ビニル  
 ABS ; ABS樹脂  
 PS ; ポリスチレン  
 PE ; ポリエチレン  
 PP ; ポリプロピレン  
 EVA ; エチレン・酢酸ビニル共重合体

フタル酸エステルの略語

DBP ; フタル酸ジブチル  
 DEHP ; フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)  
 DEHA ; アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)  
 DNP ; フタル酸ジ-n-ニル  
 DINP ; フタル酸ジイソノニル

表 I-1-2 ポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステルの含有量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル (%)				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
楽器 B		PS	-	-	-	-	-
ストロー B	ストロー	PVC	1.3	-	-	-	-
	笛, 接続部	PE	-	-	-	-	-
指遊び		PS, EVA	-	-	-	-	-
ビーチボール		PVC	-	25.3	-	-	-
キッチンセット	その他	PP, PE	-	-	-	-	-
	目玉焼き	PVC	-	-	-	-	18.2
ままごとセット	食べ物 (1)	PP, PE	-	-	-	-	-
	食べ物 (2)	PVC	-	23.9	-	-	-
	缶詰	PE	-	-	-	-	-

材質の略語

PVC: ポリ塩化ビニル  
 ABS: ABS樹脂  
 PS: ポリスチレン  
 PE: ポリエチレン  
 PP: ポリプロピレン  
 EVA: エチレン・酢酸ビニル共重合体

フタル酸エステルの略語

DBP: フタル酸ジブチル  
 DEHP: フタル酸ジ2-エチルヘキシル  
 DEHA: アジピン酸ジ2-エチルヘキシル  
 DNP: フタル酸ジ-n-ノニル  
 DINP: フタル酸ジイソノニル

「ままごとセット」は食べ物-2 部分がそれぞれ PVC 製であったことがそれぞれ確認された。

上記したおもちゃそれぞれの部品, 39 部分についてフタル酸エステル (DEHA を含む) を分析した結果, PVC 製部品以外の材質部分からは全く検出されなかった。PVC 製部品では 8 部品から, DINP が最小で「キッチンセット」目玉焼き部分の 18.2%, 最高で「おしゃぶり」おしゃぶり部分の 58.3% が検出された。また, これらの 8 部品からは他種のフタル酸エステルは検出されなかった。

DNP は「ソフトドール-V」のみに検出され, その含有量は 3.4% であった。他の PVC 製部品からは検出されなかった。DEHA は 7 部品から検出され, その最小は「ボール-A」桃色部分で 0.6%, また最大は「ボール-B」の赤色部分で 1.5% であった。他の PVC 製品からは検出されなかった。DEHP は 17 部品か

ら検出された。その量の最小は「チャイム」の本体部分で 0.2%, 最大は「ボール-D」の青色透明部分で 39.1% であった。他の部品は全く検出されなかった。DBP は 14 部品から検出され, 最小は「ままごと道具-G」のプリンアラモードで 0.3%, 最大は「ボール-D」青色透明部分で 22.3% であった。

今回調査したおもちゃ試験品, 39 部品の中で, DEHA を含むフタル酸エステルが確認できたものは PVC 製の試験品のみであり, このうちフタル酸エステルが 3 種類検出された試験品は, PVC 製品 26 部品のうち 7 部品であり, そのエステルは DBP, DEHP, DEHA であった。また, フタル酸エステルが 2 種類検出された部品は 6 部品で, そのエステルは DBP と DEHP が 3 部品, DEHP と DNP が 1 部品であった。

とくに, 乳幼児が口の中に入れるものとして「おしゃぶり」, 「歯がため」および「ガ

ラガラ-A」は DINP が単独で高濃度含有されていることが明らかとなった。

これら DEHA を含むフタル酸エステルは、内分泌攪乱物質として危惧されていることから、これらフタル酸エステルを含有しないものを製品化しなければならないと思われる。

#### 4- まとめ

フタル酸エステル DEP, DPP, DBB, BBP, DCHP, DHpP, DPeP, DEHP, DOP, DNP, DINP の 11 種とアジピン酸エステル DEHA の 1 種あわせて 12 種の GC と GC-MS および HPLC による一斉分析法について検討した。さらに得られた分析法を用いて、市販おもちゃ中のフタル酸エステルの種類とその含有量について調査し、次のような結果が得られた。

1, GC 分析ではフタル酸エステルの DINP を除く 11 種 (DEHA を含む) の一斉分析法が確立できた。また、DINP の GC 分析は多数の異性体があるので、個別分析とした。

2, GC-MS 分析はフタル酸エステルそれぞれから共通のフラグメントイオン  $m/e149$  が確認され、これを GC-MS 分析の定量イオンとした。また、同定はエステル個々のマススペクトルから行なった。

3, HPLC 分析は、紫外外部吸収波長 224nm でアセトニトリルグラジエント溶出法を用い、DEHA を除くフタル酸エステル 11 種の分析条件を確立した。

4, GC 分析, GC-MS 分析および HPLC 分析それぞれの方法を用いて、乳児用おもちゃ 18 種に含有するフタル酸エステルの分析を行なった。その結果、おもちゃ PVC 製品すべてからフタル酸エステル (DEHA を含む) が検出され、PVC 製以外の部品からは検出されな

った。

今回の調査で検出されたフタル酸エステルは DBP, DEHP, DEHA, DNP, DINP の 5 種類であった。また、その含有量は 0.2%~58.3% であった。

#### 参考文献

- 1) 高橋保雄, 「フタル酸エステル等の分析法」, 第 24 回日本環境化学会講演会資料集, pp87~91 (1998)

## Ⅱ. 人工唾液による、おもちゃに含まれるフタル酸ジイソノニル(DINP)の溶出条件の検討

### 1- まえがき

前報Ⅰにおいてフタル酸エステル(GC, GC-MS)およびHPLCそれぞれの分析法の設定をし、本分析法を用いて、おもちゃ18種のPVC製部品に含まれるフタル酸エステルの種類とその含有量について報告した。

本報Ⅱでは、フタル酸エステルのDINPが高濃度で含有していて、乳幼児が口腔内に入るおもちゃとして、「おしゃぶり(DINP含有量58.3%)」を用いて、人工唾液によるDINPの溶出条件について種々検討した。

### 2- 実験方法

#### 試薬・器具

本実験に用いた試薬・器具はすべて前報Ⅰに準じた。

人工唾液； 塩化ナトリウム4.5g, 塩化カリウム3.0g, 無水硫酸ナトリウム0.3g, 塩化アンモニウム0.4g, 乳酸3.0gおよび尿素0.2gをそれぞれ蒸留水1Lに溶かしたものを人工唾液として用いた。

#### 装置

振とう回数可変装置付上下振とう機：

RECIPRO SHAKER, SR-IIW, タイテック社製

振とう回数可変装置付左右振とう培養器：

UNI THERMOSHAKE, NTS-2000, EYELA社製

その他、本実験で使用した装置は前報Ⅰに準じた。

#### 試験片の作製

試験品おもちゃのポリ塩化ビニル製「おしゃぶり(DINP含有量58.3%)」を表面積が

15cm<sup>2</sup>となるように縦3cm, 横2.5cmに切片したものを試験片とした。

#### 人工唾液によるDINPの溶出試験

試験片(表面積15cm<sup>2</sup>)1cm<sup>2</sup>あたり、溶出溶媒2mLとなるように、本実験での溶出溶媒量は人工唾液30mLとした

1) 上下振とう及び左右振とうによる溶出：

試験片をネジ蓋付50mL容遠心分離管、または共栓付100mL容三角フラスコにとり、人工唾液を30mL加えた後、蓋または共栓をし、15分間ずつの振とう溶出を第1区分とし、合計4区分(60分間)の溶出試験を行なった。第1区分ごとに溶出溶媒を適量採取し、新しく溶出溶媒の人工唾液30mLを加えて第2区分の振とう溶出を行なった。同様に3, 4区分の振とう溶出を行なった。

2) ビー玉添加による振とう溶出：

上下振とう溶出におけるビー玉添加試験では、上記した1)のネジ蓋付50mL容遠心分離管に、試験片を入れた後、同分離管に必要な数のビー玉を添加し、以下同様に調製した。

また左右振とう溶出試験の場合はネジ蓋付50mL容遠心分離管に、上記と同様に調製したものを振とうしても遠心分離管内の溶出溶媒がほとんど動かず、この試験は不可であることが分かったので、遠心分離管のかわりに、共栓付100mL容三角フラスコを用いた。

#### DINPの測定

得られたそれぞれの溶出液5mLにアセトニトリル5mLを加え、激しく振とうし、これをHPLC分析用試験液とした。それぞれ区分の溶出溶媒中のDINP量を前報Ⅰに準じてHPLC分析を行なった。



### 3- 実験結果および考察

#### 上下振とうによる DINP の溶出

上下振とうの振とう回数を 250 回/分、300 回/分とそれぞれ変化させ、15 分間ずつ 4 回それぞれの振とう回数で DINP の溶出を検討した。その結果を表 II-1 に示した。振とう回数 250 回/分と 300 回/分それぞれの 60 分間での DINP の総溶出量はそれぞれ 56.1  $\mu$ g と 1588  $\mu$ g で、振とう回数 300 回/分の溶出量は、250 回/分のそれぞれ 28 倍量であった。また溶出時間(15 分間の区分間)の DINP 溶出量は、第 1 区分および第 2 区分、第 3 区分、第 4 区分とも同様の結果であった。

一方、振とう回数 250 回/分と 300 回/分それぞれの区分間 DINP 溶出量の減少率は、第 1 区分と第 4 区分とを比較すると、250 回/分の場合約 30%、300 回/分で約 10%であり、振とう回数 300 回/分が DINP を一定に溶出することが明らかになった。

つぎに、振とう時間の変化とともに DINP の溶出量が減少する傾向が見られたことから、振とう回数 300 回/分で、振とう時間を 15 分間ずつ 12 回、計 180 分の DINP 溶出量の変化を検討した。その結果を図 II-1 に示した。振とう時間が長くなるにつれ DINP 溶

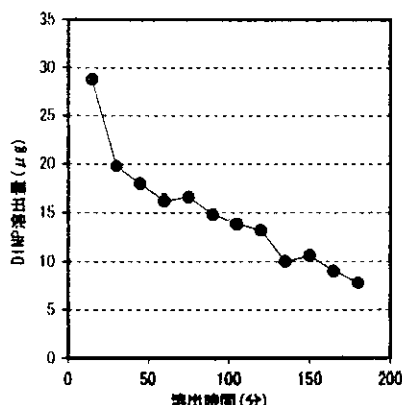


図 II-1 上下振とうによるPVC製品からのDINP溶出量の経時変化  
 試験品：おしゃぶり (DINP含有量58.3%)  
 ●-●-●- DINP溶出量(μg)

表 II-1 DINPの上下振とう溶出に及ぼす

振とう回数の影響

		DINP溶出量 (μg)	
		振とう回数 250回/分	300回/分
区分	振とう時間(分)		
1	0 - 15	15.3 [0.5]	400 [13.3]
2	15 - 30	17.1 [0.6]	440 [14.7]
3	30 - 45	13.2 [0.4]	397 [13.3]
4	45 - 60	10.5 [0.4]	351 [11.7]
総DINP溶出量		56.1 [0.5]	1588 [13.3]

DINP：フタル酸ジイソノニル

[ ]内：唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)

振とう条件：上下振とう、振幅40mm、室温(18°C)

溶出溶媒：人工唾液 30mL/1区分

試験品：おしゃぶり (DINP含有量58.3%)

出量は減少し、165~180 分間での溶出量は最初の 15 分間の約 25%量であった。

#### 左右振とうによる DINP の溶出

振とう培養器の振幅は 40mm で、振とう回数を 1 分間に 80 回、100 回、120 回および 160 回と変化させ、振とう時間を 15 分間ずつを 1 区分、2 区分、3 区分および 4 区分とし、DINP の溶出量を測定した。その結果を表 II-2 に示した。振とう回数が 80、100、120 回/分および 160 回/分それぞれの DINP 総溶出量はそれぞれ 175  $\mu$ g、153  $\mu$ g、720  $\mu$ g および 1840  $\mu$ g であった。80 回/分、100 回/分それぞれの総溶出量に大きな差は見られなかったが、120 回/分のそれと大きな差が現れた。また、160 回/分とではさらに大きな差となった。各振とう区分の DINP 溶出量をそれぞれ比較すると、80 回/分、100 回/分には区分間において大きなバラツキがあ

表II-2 DINPの左右振とう溶出に及ぼす振とう回数の影響

		DINP溶出量 (μg)			
区分	振とう時間(分)	振とう回数 80回/分	100回/分	120回/分	160回/分
1	0 - 15	102 (3.4)	107 (3.6)	207 (6.9)	521 (17.4)
2	15 - 30	40.4 (1.3)	14.4 (0.5)	257 (8.6)	453 (15.1)
3	30 - 45	21.9 (0.7)	15.1 (0.5)	137 (4.6)	440 (14.7)
4	45 - 60	10.7 (0.4)	17.6 (0.6)	119 (4.0)	426 (14.2)
総DINP溶出量		175 (1.5)	153 (1.3)	720 (6.0)	1840 (15.3)

DINP: フタル酸ジイソノニル  
 ( ) 内; 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)  
 振とう条件: 左右振とう, 振幅 40mm, 37°C  
 溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分  
 試験品: おしゃぶり(DINP含有量58.3%)

った。120回/分では若干の差がでたが、160回/分では問題となるバラツキは見られなくなった。

また、振とう回数160回/分でのDINP溶出量は各区分および総溶出量それぞれにおいて、上下振とうの300回/分溶出量にほぼ近い値であった。

### ビー玉添加によるDINP溶出の補助効果

上下振とうおよび左右振とうそれぞれの

表II-3 DINPの上下振とう溶出に及ぼすビー玉添加の影響

		DINP溶出量 (μg)				
区分	振とう時間(分)	ビー玉数 対象 (コ)	2	6	10	12
1	0 - 15	400 (13.3)	243 (8.1)	237 (7.9)	93.1 (3.1)	64.5 (2.2)
2	15 - 30	440 (14.7)	183 (6.1)	210 (7.0)	69.1 (2.3)	70.2 (2.3)
3	30 - 45	397 (13.2)	171 (5.7)	234 (7.8)	74.8 (2.5)	70.2 (2.3)
4	45 - 60	351 (11.7)	152 (5.1)	224 (7.5)	80.8 (2.7)	68.5 (2.3)
総DINP溶出量		1588 (13.2)	749 (6.2)	905 (7.5)	318 (2.6)	273 (2.3)

DINP: フタル酸ジイソノニル  
 ( ) 内; 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)  
 振とう条件: 左右振とう, 振幅 40mm, 振とう回数 300回/分, 室温(18°C)  
 溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分  
 試験品: おしゃぶり(DINP含有量58.3%)

溶出時にビー玉を添加し、DINPの溶出が振とう時間で一定の溶出量が得られるかどうかを検討した。その結果を表II-3と表II-4に示した。上下振とう溶出は振とう回数300回/分、左右振とう溶出は振とう回数120回/分、振幅を40mmとした。

上下振とう溶出の場合、DINPの総溶出量はビー玉添加なしが1588μg、2コ添加で749μg、6コで905μg、10コで318μg、12コの場合273μgであった。上下振とう溶出にビー玉を添加することにより、DINP総溶出量は添加なしの場合と比べ減少した。特に、ビー玉の数が12コするとき極端に減少した。これは、試験片が溶出溶媒中でほとんど動かなかったためと考えられる。

左右振とう溶出でのDINP溶出量に対するビー玉の添加の影響を、ビー玉添加なしあるいは3コ添加し、溶出用容器(底面の大きさ)を変化させ、振とう回数120回/分、37°Cで検討した。その結果、溶出用容器の大きさによってDINPの溶出量に影響がでた。底面が平底で大きさ6cmの100mL容の三角フラスコに、ビー玉を3コ加え溶出を行なったとき、

表II-4 DINPの左右振とう溶出に及ぼすビー玉添加の影響

		DINP溶出量 (μg)					
区分	振とう時間(分)	容器底面の型		直径7cmの平底			
		直径6cmの平底 (100mL三角フラスコ)		(200mL三角フラスコ)			
		ビー玉数		無		有	
1	0 - 15	207 (6.9)	115 (3.8)	261 (8.7)	434 (14.5)		
2	15 - 30	256 (8.5)	139 (4.6)	252 (8.4)	365 (12.2)		
3	30 - 45	137 (4.6)	128 (4.3)	125 (4.2)	296 (9.9)		
4	45 - 60	119 (4.0)	114 (3.8)	153 (5.1)	278 (9.3)		
総DINP溶出量		719 (6.0)	496 (4.1)	791 (6.8)	1373 (11.4)		

DINP: フタル酸ジイソノニル  
 ( ) 内; 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)  
 振とう条件: 振幅 40mm, 振とう回数 120回/分の左右振とう, 37°C  
 ビー玉の数: 無-0個, 有-3個  
 溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分  
 試験品: おしゃぶり(DINP含有量58.3%)

ビー玉無しの対象に比べて DINP 溶出量は約 35%の減少であった。一方、200mL 容三角フラスコでは、底面が平底で 7.5cm であり、ビー玉添加と添加しない対象を比べた場合、DINP 総溶出量は 791  $\mu\text{g}$  と 1391  $\mu\text{g}$  であり、ビー玉を添加することにより溶出量は約 75% 増加した。これは試験片と溶出溶媒が効率よく接触するためと考えられる。

以上の結果より、上下振とう溶出にビー玉を添加したとき、ビー玉の数が多くなるほど溶出量が減少し、ビー玉を全く添加しない上下振とう溶出が、今回検討した溶出実験中で最大の溶出量となった。一方、ビー玉を 3 コ添加し振とう回数 120 回/分で左右振とうを行なうことで、人工唾液による DINP 溶出量は、各溶出時間(各区分間)でほぼ一定の値となり、60 分間を通して安定した溶出傾向となることが明らかとなった。

## 人工唾液による PVC 製おもちゃのフタル酸エステル溶出量

前報 I でフタル酸エステルの含有が確認された PVC 製のおもちゃの試験品のなかで、DBP, DEHP, DEHA, DINP をそれぞれ単独もしくは数種類含む試験品「がらがら-A」顔面部、「歯がため」歯がため部、「おしゃぶり」おしゃぶり部、「ボール-A」黄色部および桃色部、「ボール-B」青色部および赤色部、「ボール-D」黄色透明部、「キッチンセット」目玉焼き部、「ままごとセット」食べ物-2 部の合計 8 種、10 部品を選択し、人工唾液による上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれにおけるフタル酸エステル溶出量に、試験品間またはエステルの種類間によって違いが生じるかどうかを検討した。

上下振とう溶出と、ビー玉を加えた左右振とう溶出それぞれの溶出条件は、振とう回

表 II-5-1 上下振とうによるポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステル類の溶出量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル ( $\mu\text{g}$ )				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
がらがら A	顔面	PVC	-	-	-	-	1498
歯がため	歯がため	PVC	-	-	-	-	1267
おしゃぶり	おしゃぶり	PVC	-	-	-	-	1583
ボール A	黄色部	PVC	626	762	N. D.	-	-
	桃色部	PVC	534	714	N. D.	-	-
ボール B	青色部	PVC	729	694	N. D.	-	-
	赤色部	PVC	656	735	N. D.	-	-
ボール D	黄色透明部	PVC	840	759	-	-	-
キッチンセット	目玉焼き	PVC	-	-	-	-	462
ままごとセット	食べ物 (2)	PVC	-	130	-	-	-

溶出条件：溶出面積  $\times$  2ml の人工唾液量で 1 時間 (15  $\times$  4 分間) 溶出

振とう条件：上下振とう 300 回/分

N. D. : 4  $\mu\text{g}$

### 材質の略語

PVC：ポリ塩化ビニル

### フタル酸エステルの略語

DBP：フタル酸ジブチル

DEHP：フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

DEHA：アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)

DNP：フタル酸ジ-n-ノニル

DINP：フタル酸ジイソノニル

表Ⅱ-5-2 左右振とうによるポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステル類の溶出量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル (μg)				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
がらがら A	顔面	PVC	-	-	-	-	309
歯がため	歯がため	PVC	-	-	-	-	223
おしゃぶり	おしゃぶり	PVC	-	-	-	-	697
ボール A	黄色部	PVC	262	N. D.	N. D.	-	-
	桃色部	PVC	278	219	N. D.	-	-
ボール B	青色部	PVC	282	260	N. D.	-	-
	赤色部	PVC	220	208	N. D.	-	-
ボール D	黄色透明部	PVC	241	149	-	-	-
キッチンセット	目玉焼き	PVC	-	-	-	-	N. D.
ままごとセット	食べ物 (2)	PVC	-	N. D.	-	-	-

溶出条件：溶出面積×2mlの人工唾液量で1時間(15×4分間)溶出。ビー玉3コ添加振とう条件：左右振とう。振幅40mm, 120回/分

N. D. : 4μg

材質の略語

PVC：ポリ塩化ビニル

フタル酸エステルの略語

DBP：フタル酸ジブチル

DEHP：フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

DEHA：アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)

DNP：フタル酸ジ-n-ノニル

数 300 回/分と 120 回/分とし、溶出時間(振とう時間)を 60 分間とした。その結果を表Ⅱ-5 に示した。

今回使用した PVC 製おもちゃの試験品について、上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれで得られたフタル酸エステルは、各試験品ごとの材質試験によって確認されたものと一致した。またその溶出量は、左右振とう溶出より上下振とう溶出が 2~5 倍多かった。試験品(材質中)に含有するフタル酸エステルが 1%前後の場合、上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれからの溶出量が検出限界以下(4μg 以下)という結果は、フタル酸エステルの物理化学的性質あるいは、PVC 製おもちゃそれぞれの表面構造や表面コーティングなどの影響と考えられた。

以上より人工唾液による上下振とうと左右振とうそれぞれの溶出法によるフタル酸エステル溶出量に差が見られた。しかし、各

試験品の材質中含有量と比較すると、そのエステル溶出率には大きな差が見られなかった。

これらの結果から、溶出法それぞれについてはⅢ報での『ヒト口腔内での唾液への移行溶出試験の検討』から、その移行溶出量に近い溶出試験法の設定の基となると考えられる。

#### 4. まとめ

DINP を高濃度含有し、乳幼児が口にしている目的で作られた PVC 製のおしゃぶり「おしゃぶり (DINP 含有 58.3%)」を用い、人工唾液による溶出条件について種々の検討を行ない、以下のような結果が得られた。

1) 上下振とう溶出により、溶出時間(15 分間の区分)ごとの DINP 溶出量は、振とう回数 250 回/分、300 回/分ともに、ほぼ一定であった。60 分間の総溶出量は 56.1μg および