

(2)靴下:製品数106 判明数19

大分類		中分類		細分類	
無機系	6	金属塩	6	銀	3
有機系	55	ビグアナイド	1	—	—
		第四アンモニウム塩	50	—	—
		カルボン酸	3	—	—
		ピリジン	1	ピリチオン系化合物	1
天然有機系	19	糖質	9	キトサン	9
		エステル	6	ウンデシレン酸モノグリセライド	2
		その他(天)	4	天然イオウ	1
				フラボノイド系	1

2-2. 化学製品: 調査製品数も判明数も多いのが化学製品である。これら製品の表示は防カビ・防虫等と幾つもの中分類に分類される表示で併記されているものが多かった。そこで、製品を分類する際に優先順位をつけた。まず、(6)洗剤・洗浄剤と記載されている製品は、全て抗菌・除菌などと併記されている製品である。これを中分類の優先順位1位にした。その次に、(1)抗菌剤、(2)除菌剤、(3)防カビ剤、(4)防臭・消臭・芳香剤、(5)防虫剤と順位づけた。例えば、抗菌・除菌と併記の製品は抗菌剤に分類した。表6に、(1)抗菌剤、(2)除菌剤、(3)防カビ剤、(4)防臭・消臭・芳香剤、(5)防

虫剤、及び(6)洗剤・洗浄剤へ使用されていた薬剤を示す。

(1)抗菌剤は薬剤そのものよりシート類が多いため判明率は42.5%と低かった。(2)除菌剤は53/63 (84.1%)と高い判明率であり、アルコールの使用が多かった。天然有機系薬剤の添加も多くなっている。(3)防カビ剤は、防虫剤との併記が多いため(13製品)、薬剤も防虫剤を使用してある製品が多かった。(4)防臭・消臭・芳香剤は、使用薬剤表示割合が16/34 (47%)と低かった。使用薬剤も天然有機系薬剤使用が多く、香りづけを目的とした製品が多い。(5)防虫剤数は少ないが、こ

表6 化学製品に使用されていた抗菌薬剤

(1)抗菌剤:製品数47 判明数20

大分類		中分類		細分類	
無機系	13	金属塩	13	銀	1
有機系	23	界面活性剤	4	ポリオキシエチレンアルキルエーテル	1
				ラウリル硫酸塩	1
				高級アルコール系(非イオン)	1
				多価アルコール系化合物	1
		アルコール	1	—	—
		ピレスロイド系	6	—	—
		イミダゾール系	2	ベンゾイミダゾール	2
		その他(有)	2	エデト酸塩	1
ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	1				
天然有機系	16	糖質	2	キトサン	2
				安息香酸塩	1
		その他(天)	11	柿フラボノイド	1
				竹の抽出エキス	1
				孟宗竹乾留パウダー	1
				カラシ抽出物	1
				天然からし成分	4
				備長炭	4
				活性炭	1

れは優先順位が低いため、実際に防虫と表示されていた製品は33製品あった。ピレスロイド系かパラジクロロベンゼン等の防虫剤が使用されており、表示割合も高かった。(6)洗剤・洗浄剤は優先順位が1番のため

抗菌、除菌、防カビ等と併記されている製品数が多く、表示割合も130/145 (89.6%) と高かった。当然界面活性剤や、酸・アルカリ使用が多い。酵素使用の製品も24製品あった。

(2)除菌剤:製品数63 判明数53

大分類		中分類		細分類	
無機系	6	金属塩	2	銀	1
		その他(無)	4	トルマリン	1
				次亜塩素酸塩	4
有機系	55	ビグアナイド	3	グルコン酸クロルヘキシジン	3
				第四アンモニウム塩	9
		界面活性剤	20	アルキルアミノオキシド	4
				アルキルグルコシド	2
				セチルピリニジウムクロリド(塩化セチルピリニジウム)	2
				純石けん分(脂肪酸ナトリウム)	1
				高級アルコール系(非イオン)	1
				アルコール	38
		パラベン	8	エチルアルコール	32
				トリエチレングリコール	1
				ブチレングリコール(BG)	3
				エチルパラベン	3
		エステル	1	プロピルパラベン	1
				メチルパラベン	2
				芳香族系カルボン酸エステル	1
カルボン酸	1	クエン酸	1		
フェノール	3	イソプロピルメチルフェノール	3		
その他(有)	7	塩酸ラウリルアミドブチルグアニジン	1		
		安息香酸塩	1		
		グリコールエーテル	4		
		エデト酸塩	1		
天然有機系	19	テルペン	1	ユーカリエキス	1
		その他(天)	13	アロエエキス	2
				緑茶エキス	1
				緑茶抽出物	1
				柿抽出物	1
				植物フラボノイド	1
				グレープフルーツ種子抽出物	1
				シャクヤク根エキス	1
				トウモロコシ由来消臭成分	3
				トレハロース	1
				ノンチ(液状活性炭)	2
				モモ葉エキス	1
				針葉樹系精油	1

(3)防カビ剤:製品数22 判明数14

大分類		中分類		細分類	
無機系	0	—	—	—	—
有機系	13	界面活性剤	1	—	—
		アルコール	1	フェノキシエタノール	1
		フェノール	4	パラクロールメタキシレノール(PCM)	2
				3-メチル-4-イソプロピルフェノール	1
				チモール	1
		ピレスロイド系	5	エムペントリン	4
		イミダゾール系	3	ベンゾイミダゾール	2
		その他(有)	6	ナフタリン	1
パラジクロロベンゼン	5				
天然有機系	4	テルペン	1	カルボン	1
		その他(天)	2	天然からし成分	1
				活性炭	1
				天然わさび成分	1

(4)防臭・消臭・芳香剤:製品数34 判明数16

大分類		中分類		細分類	
無機系	5	金属塩	5	酸化亜鉛	3
				酸化銀	1
				ミョウバン	1
				酸化チタン	2
有機系	19	界面活性剤	15	—	—
		アルコール	6	エチルアルコール	6
		その他(有)	2	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	1
安息香酸ソーダ	1				
天然有機系	21	その他(天)	7	カテキン	3
				緑茶エキス	1
				緑茶カテキン	2
				茶抽出物	1
				植物抽出液	15

(5)防虫剤:製品数9 判明数9

大分類		中分類		細分類	
無機系	0	—	—	—	—
有機系	7	アルコール	1	フェノキシエタノール	1
		フェノール	1	パラクロールメタキシレノール(PCM)	1
		ピレスロイド系	6	エムペントリン	3
				フェントリン	2
				プロフルトリン	1
その他(有)	1	パラジクロロベンゼン	1		
天然有機系	2	テルペン	1	ヨモギエキス	1
		その他(天)	1	しょう脳	1
		植物抽出液	1	—	—

(6)洗剤・洗浄剤:製品数145 判明数130

大分類		中分類		細分類	
無機系	49	その他(無)	49	塩酸	2
				過酸化水素	4
				けい酸塩	1
				次亜塩素酸塩	6
				次亜塩素酸カルシウム	1
				次亜塩素酸ナトリウム	6
				水酸化ナトリウム	11
				硫酸塩	2
				硫酸ナトリウム	1
				過硫酸水素カリウム複合塩	2
				モノ硫酸水素カリウム	1
				過ホウ酸ナトリウム	1
				炭酸塩	14
				炭酸ナトリウム	5
				炭酸水素ナトリウム	3
				過炭酸ソーダ	1
				過炭酸ナトリウム	11
				過炭酸塩	2
				スルファミン酸	2
				有機系	134
アルカノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム	1				
アルカンスルホン酸ナトリウム	1				
アルキルアミドアミン塩	1				
アルキルアミンオキシド	23				
アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム	19				
アルキルグルコシド	6				
アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム	1				
アルキルスルホン酸ナトリウム	1				
アルキルスルホ酢酸ナトリウム	1				
アルキルトリメチルアンモニウム塩	1				
アルキルヒドロキシスルホベタイン	3				
アルキルベタイン	1				
アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩	1				
アルキル硫酸エステル塩	1				
アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム	4				
アルファオレフィン系	1				
アルファスルホ脂肪酸エステルナトリウム	3				
エステル型ジアルキルアンモニウム塩	7				
ジアルキルイミダゾリニウム塩	1				

有機系		界面活性剤	ジアルキルジメチルアンモニウム塩	2	
			セチルピリニジウムクロリド(塩化セチルピリニジウム)	0	
			ソホロリピッド	1	
			ポリエーテルポリオール	2	
			ポリエチレングリコール	1	
			ポリオキシアルキレンアルキルエーテル	5	
			ポリオキシアルキレンラウリルエーテル	1	
			ポリオキシエチレンアルキルエーテル	29	
			ポリオキシエチレンエーテル	0	
			ラウリル硫酸ソーダ	1	
			ラウリル硫酸塩	0	
			高級アルキルアミン系(非イオン)	2	
			高級アルコール系(非イオン)	4	
			脂肪酸アミドプロピルベタイン	2	
			脂肪酸アルカノールアミド	6	
			純石けん分(脂肪酸カリウム)	0	
			純石けん分(脂肪酸ナトリウム)	3	
			直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	5	
			直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩	2	
			直鎖アルキルベンゼン系	1	
		第四級アンモニウム塩系	1		
		アルコール	5	エチルアルコール	3
				エチレングリコール	1
		カルボン酸	1	クエン酸	1
		イソチアゾリン系	2	—	—
		その他(有)	10	エデト酸ナトリウム	1
				グリコールエーテル	1
		グリコール酸	1		
		ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	2		
		トリクロロイソシアヌル酸	5		
天然有機系	37	その他(天)	36	オレンジオイル	3
				リモネン(オレンジオイル)	1
				緑茶乾留物	1
				緑茶抽出物	3
				竹エキス	2
				フラボノイド系	1
				ヤシ油脂肪酸アマイド	1
				レモン酸	1
				果実酸	1
				酵素	24
				水溶性大豆レシチン	1
				天然レモン酸	1
				天然植物エキス	1
		植物抽出液	2	—	—

2-3. 寝具：寝具は、同じ繊維製品である衣服と比べて14/60 (23.3%) と薬剤判明割合が低かった。製品数の多い(1)布団と、(2)シーツ・カバーの使用薬剤を表7に示す。

2-4. インテリア：インテリアの薬剤判明割合は、16/44 (36.4%) であった。製品数の多い(1)床敷物と(2)その他の床敷物の使用薬剤を表8に示す。

表7 寝具に使用されていた抗菌薬剤

(1)布団：製品数17 判明数1

大分類		中分類		細分類	
無機系	1	金属塩	1	銀亜鉛系化合物	1
有機系	4	第四アンモニウム塩	3	—	—
天然有機系	0	—	—	—	—

(2)シーツ・カバー：製品数26 判明数3

大分類		中分類		細分類	
無機系	1	金属塩	1	銀	1
有機系	2	第四アンモニウム塩	1	—	—
		カーバニリド	1	フェニルアミド系化合物	1
天然有機系	1	糖質	1	キトサン	1

表8 インテリアに使用されていた抗菌薬剤

(1)床敷物：製品数25 判明数9

大分類		中分類		細分類	
無機系	1	金属塩	1	—	—
有機系	0	—	—	—	—
天然有機系	9	糖質	7	キトサン	7
		トロポロン	2	青森ヒバ油	2

(2)その他の床敷物：製品数11 判明数5

大分類		中分類		細分類	
無機系	4	金属塩	4	抗菌性ゼオライト	1
				銀	3
有機系	4	第四アンモニウム塩	3	—	—
		ピレスロイド系	1	—	—
天然有機系	1	糖質	1	キトサン	1

2-5. 台所用品：台所用品の薬剤判明割合は、13/65 (20%) と低かった。製品数の多い(1)調理用具と(2)飲

食器の使用薬剤を表9に示す。

表9 台所用品に使用されていた抗菌薬剤

(1)調理用具：製品数20 判明数2

大分類		中分類		細分類	
無機系	8	金属塩	8	金属銅	1
				銀	1
				酸化チタン	1
有機系	2	—	—	—	—
天然有機系	0	—	—	—	—

(2)飲食器：製品数5 判明数2

大分類		中分類		細分類	
無機系	0	—	—	—	—
有機系	0	—	—	—	—
天然有機系	2	その他(天)	2	天然わさび成分	2

2-6. 電機製品、電機製品関連製品：電機製品、電機製品関連製品の中で製品数の多かった(1)冷暖房器具

と(2)掃除機用紙パックの使用薬剤を表10に示す。

表10 電気製品、電気製品関連製品に使用されていた抗菌薬剤

(1)冷暖房器具：製品数38 判明数11

大分類		中分類		細分類	
無機系	5	金属塩	5	酸化チタン	5
有機系	4	ピグアナイド	4	—	—
天然有機系	6	その他(天)	6	緑茶カテキン	3
				ポリフェノール	1
				炭	1
				酵素	2

(2)掃除機用紙パック：製品数15 判明数12

大分類		中分類		細分類	
無機系	8	金属塩	8	抗菌性セラミック	1
				亜鉛化合物	4
				炭酸亜鉛化合物	1
				金属フタロシアニン誘導体	2
有機系	10	ピグアナイド	2	クロロヘキシジン	2
		第四アンモニウム塩	1	—	—
		カルボン酸	3	ポリカルボン酸	2
				ポリカルボン酸ナトリウム塩	1
		ピリジン	1	ジンクピリチオン	1
		その他(有)	3	オキシトリカルバリル酸	2
天然有機系	4	その他(天)	4	ポリカルボキシル酢酸	1
				フラボノイド系	3
				ポリフェノール系	1

2-7. 日用雑貨品：日用雑貨品の製品数は多いが、薬剤判明割合は、51/237 (21.5%) と低かった。製品数の多い(1)清掃用品、(2)風呂用品、(3)衛生材料さらに今後増加してくると考えられる(4)衛生用パッドの使用薬剤を表11に示す。衛生用パッドは老人等の体力が弱った人を対象に使用される製品が多い。従って、これら製品には安全な薬剤を使用し、薬剤名も正確に表示しなければならない。

2-8. 乳幼児用品：乳幼児用品の調査製品数は少ないが、薬剤判明割合は、18/21 (85.7%) と高く、安全な天然系有機系薬剤を使用したと表示している製品が多い。しかし、天然系薬剤が必ずしも安全とは限らない。SEKの申し合わせ事項にあるように、乳幼児用品には抗菌加工を施すべきではないと考える。

2-9. 履物、ペット用品：履物、ペット用品の製品は増加しているが、薬剤判明割合は各々9/48 (18.8%)、8/33 (24.2%) と低かった。今後これら用品の加工薬剤も明瞭に表示する必要があると考える。

表11 日用雑貨品に使用されていた抗菌薬剤

(1)清掃用品:製品数57 判明数7

大分類		中分類		細分類	
無機系	9	金属塩	9	金属銅	2
				銀	1
				ゼオミック	3
有機系	2	第四アンモニウム塩	1	有機シリコーン第四級アンモニウム塩	1
天然有機系	3	トロボロン	3	ヒノキチオール	3

(2)風呂用品:製品数35 判明数6

大分類		中分類		細分類	
無機系	6	金属塩	6	銀	2
				抗菌性セラミック	2
有機系	0	—	—	—	—
天然有機系	2	トロボロン	2	ヒノキチオール	2

(3)衛生材料:製品数35 判明数16

大分類		中分類		細分類	
無機系	3	金属塩	3	銀ゼオライト	1
有機系	2	ビグアナイド	1	クロロヘキシジン	1
		第四アンモニウム塩	1	塩化ベンザルコニウム	1
天然有機系	13	糖質	12	キトサン	12
		その他(天)	1	緑茶カテキン	1

(4)衛生用パッド:製品数15 判明数3

大分類		中分類		細分類	
無機系	0	—	—	—	—
有機系	5	—	—	—	—
天然有機系	3	その他(天)	3	緑茶カテキン	1
				活性炭	2

まとめ

抗菌製品の市販実態を把握するため、抗菌製品表示の店頭調査を継続して行った。家庭用抗菌製品分類表(大・中・小)を改訂すると共に、新たに抗菌薬剤分類表(大・中・細)を作成した。それらの分類表に基づいて、調査製品の集計と製品種類別の使用薬剤の集計を行った。調査製品数は1163製品であった。細分類の薬剤まで判明した製品は466製品(40.1%)であった。製品の種類によって使用薬剤は特徴があり、判明割合も異なっていた。天然有機系薬剤の使用が増加しているが、これらの薬剤は、成分が明らかでないものが多い。これら薬剤にも安全性評価が必要と考えられる。

本研究は、平成16年度厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)「抗菌加工製品における安全性評価及び製品情報の伝達に関する研究」によって行った。

文献

- 1) 中島晴信、大森裕子、伊佐間和郎、浅野陽子、寺地吉弘、松永一朗、宮野直子、鹿庭正昭：抗菌防臭加工剤の安全性評価に関する研究—大阪府下における抗菌加工製品の市場実態調査—、大阪府立公衆衛生研究所報告、35、109-117 (1997)
- 2) 中島晴信、大森裕子、伊佐間和郎、松永一朗、宮野直子、浅野陽子、寺地吉弘、鹿庭正昭：抗菌

- 防臭加工製品の市場調査手法の確立と調査結果、
衛生化学 (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)、44(2)、
138-149 (1998)
- 3) 中島晴信、“抗菌のすべて、基礎編、第13章(13-3)”
：抗菌加工剤の使用実態—大阪府における調査結
果から—、繊維社(大阪)、1998、pp360-pp374、
 - 4) 中島晴信、松永一朗、宮野直子、宮内留美、羅川
日出男、増田ゆり、伊佐間和郎、五十嵐良明、鹿
庭正昭：抗菌防臭加工剤の安全性評価に関する研
究—大阪府下における抗菌製品の市場実態調査
(1991年度から1999年度)—、大阪府立公衆衛生
研究所報告、38、21-32 (2000)
 - 5) 中島晴信：抗菌製品による健康障害の原因究明と
未然防止のための製品表示法の評価に関する研
究、平成14年度厚生労働科学研究分担研究報告書
(食品・化学物質安全総合研究事業)
 - 6) 中島晴信、宮野直子、松永一朗、中島ナオミ：抗
菌加工製品分類表の作成と市販製品の経年推移、
大阪府立公衆衛生研究所研究報告、42、43-55
(2004) .
 - 7) <http://www.sengikyo.or.jp/ark/kohkin-bunrui.pdf>
 - 8) 岡嶋克也：抗菌防臭・制菌、繊維と工業、60(6)、
335-342 (2004) .
 - 9) 防菌防黴学会編：防菌防黴剤事典、防菌防黴学誌、
22、(1993)
 - 10) 弓削治監修：抗菌防臭、繊維社、大阪 (1989)
 - 11) 人にやさしい繊維と加工、繊維社、大阪 (1995)
 - 12) 国民生活センター編集：家庭用品抗菌抗カビ加工
商品について、神奈川 (1995)
 - 13) 弓削治監修：抗菌のすべて、p360-374、繊維社、
大阪、(1997)

家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性：
平成9～16年度対象化学物質の結果

五十嵐良明[#]，鹿庭正昭，土屋利江

Cytotoxicity of Chemicals used in Household Products: 1997-2004

Yoshiaki Ikarashi[#], Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya

The cytotoxicities of chemicals used in household products were evaluated using a neutral red (NR) uptake assay. The chemicals tested during 1997-2004 were rubber additives (accelerators, antioxidants and retarders), solvents, plasticizers and biocides, such as antimicrobials, fungicides, preservatives used in paints, paper, wood and plastic products. The cytotoxicity potential of each chemical was classified by determining the concentrations inducing 50% reduction of NR uptake into Chinese hamster fibroblast V79 cells compared to control (IC50). In vivo eye irritancy of each chemical was estimated by the IC50 value. Most biocides tested showed strong cytotoxicity and had a high probability of inducing strong eye irritation.

Keywords: cytotoxicity, household product, biocide, rubber additive

(Received May 31, 2005)

緒言

家庭用化学製品の製造にあたってはできるだけ安全性の高い化学物質を適切な量で用いられることが望まれる。しかし、現状ではメーカーは用いている化学物質について十分なデータを持ち合わせておらず、健康被害防止についてリスク管理等の十分な評価が行われているとは言えない。厚生労働省では「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき、規制基準を設定し安全対策を講じている。さらに健康被害の未然防止策として、使用頻度、事故例の有無及び文献調査を行い、毎年3～4種の化学物質を選定して安全性評価の試験検査をしている。試験項目として、細胞毒性試験、変異原性試験、連続投与試験、生殖/発生毒性試験、感作性試験などがある。

我々は、これらの試験項目のうち細胞毒性試験を平成3年度から担当してきた。試験方法としてはニュートラルレッド (NR) 法を用いている¹⁾。NR法はドレイズ眼刺激性試験²⁾の結果と相関があるとされているが、我々も界面活性剤等で試験した結果、NR細胞毒性試験とドレイズ眼刺激性試験とが定量的にも相関があることを確かめている^{3,4)}。本研究では平成9年度から16年度に選定した28品目の細胞毒性試験の結果について報告する。

実験方法

1. 試験物質

当概年度に試験品目として選定された化学物質をTable.1に示した。これらのうち、試験メーカーから購入できるものは市販品を用い、そうでないものはメーカーから使用原体を供与された。それぞれの化学物質は精製することなくそのまま試験に用いた。

2. 細胞

チャイニーズハムスター由来線維芽細胞V79細胞を用いた。細胞はウシ胎児血清を10%含有させたEagle's MEM培地を用い、培養フラスコで増殖させた。

3. 細胞毒性試験

既報に従って行った^{3,4)}。試験時、トリプシン-EDTA溶液を用いて培養フラスコからV79細胞を回収し、リン酸緩衝液を加えて1000 rpmで5分間遠心して洗浄後、5%ウシ胎児血清を含有させたEagle's MEM培地 (FBS-MEM) に浮遊させた。96穴プレートに9000個/100 μ l/wellの割合で細胞を入れ、37°C、5%炭酸ガス培養器中で24時間培養後、上清を除き、種々の濃度の被験物質を含有させたFBS-MEMを200 μ lずつ加えた (公比2の割合で5段階、1濃度あたり4穴)。対照 (コントロール) は被験物質を含有しない新鮮培地を加えた。また、試験の妥当性と再現性を確かめるため、zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) を標準対照物質として用い、毎回同時に試験した。24時間培養後、上清を除

[#] To whom correspondence should be addressed: Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

Table.1 Result of cytotoxicity test

Chemical	Abbreviation	CAS No.	IC50 (µg/ml) ^{a)}	
Biocide				
<i>N</i> -n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	4299-07-4	6.6	Strong
1-Bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene	BECDIP	77352-88-6	1.7	Strong
	BNPD	52-51-7	7.7	Strong
Cycloacetamide	CAA	79-07-02	47.5	Moderate
<i>p</i> -Chlorophenyl-3-iodopropargylformyl	CPIP	29772-02-9	6.2	Strong
4,4'-Dimethyl-1,3-oxazoline	DMO	51200-87-4	46.0	Moderate
<i>N,N'</i> -Hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPB	Unknown	7.0	Strong
Hiba oil	HO	Unknown	16.2	Strong
	IPBC	55406-53-6	2.9	Strong
Methylene-bis(thiocyanate)	MBTC	6317-18-6	1.08	Strong
10,10'-Oxy-bis(phenoxyarsine) ^{b)}	OBPA	58-36-6	4.2	Strong
4-Chloro-3-methylphenol (<i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -cresol)	PCMC	59-50-7	89.9	Moderate
4-Chloro-3,5-dimethylphenol (<i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -xylenol)	PCMX	88-04-0	37.0	Moderate
2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	TCMSP	13108-52-6	1.32	Strong
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTBT	21564-17-0	1868	Weak
4,4'-Tetramethylene-bis(4-carbomoyl-1-decylpyridium bromide)	TMBCDPB	Unknown	6.8	Strong
Zinc naphthenate	ZnN	12001-85-3	59.0	Moderate
	ZPT	13463-41-7	0.42	Strong
Plasticizer				
Di-n-butyl sebacate	DBS	109-43-3	1600	Weak
Diethyl sebacate	DES	110-40-7	1085	Weak
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	TMPDIB	6846-50-0	170	Moderate
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	TMPMIB	25265-77-4	233	Moderate
Rubber accelerator				
Zinc butylxanthate	ZBX	150-88-9	5.6	Strong
Zinc isopropylxanthate	ZIPX	1000-90-4	18.3	Strong
Rubber antioxidant				
<i>N</i> -(1-Methylheptyl)- <i>N'</i> -phenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	MHPPD	15233-47-3	14.4	Strong
Octylated diphenylamine	ODPA	101-67-7	4500	Weak
Styrenated diphenylamine	SDPA	17796-82-6	146	Moderate
4,4'-Thio-bis(3-methyl-6- <i>tert</i> -butylphenol)	TBMBP	96-69-5	0.58	Strong
Rubber retarder				
<i>N</i> -(Cyclohexyl)thiophthalimide	CTP	17796-82-6	16.6	Strong
Solvent				
Diethylene glycol mono- <i>n</i> -butyl ether acetate	DEGEA	121-17-4	1500	Weak

^{a)} The value represents the mean of 3 experiments.

^{b)} 2% in propylene glycol.

き, NR を 50 µg/ml の濃度で含有させた FBS-MEM 200 µl ずつを加えてさらに 3 時間培養した。上清を除き, 2.5% ホルマリン - 1% CaCl₂ 溶液を 280 µl 入れて 1 分間静置して細胞を固定, 洗浄し, 上清を捨てた後, 1% 酢酸 - 50% エタノール溶液を 100 µl 加えて, 細胞内に取り込まれた NR を抽出した。540 nm における吸光度を測定し, 各物質それぞれの濃度について対照群の吸光度値に対する % を計算してこれを縦軸に, 試験濃度を対数で横軸にとったグラフにプロットした。各試験物質について吸光度を 50% にする濃度 (IC50) を求めた。実験は 3 ~ 4 回繰り返し行い, その平均値を得た。

結果と考察

細胞毒性試験はドレイズ眼刺激性試験法の代替法とし

での有用性が多くの実験者によって確認されており^{1,3-5)}, NR 取り込み能を指標とした方法もその 1 つとして上げられている。生物試験では同じ操作をしても試験ごとに若干の結果の変動が起こることが経験的にわかっており, 今回のように毒性強度をクラス分けするには一定の基準を置いて試験することが望ましい。医療機器のガイドラインでも毎回標準物質を置くことが推奨されている⁶⁾。そこで, 本研究でも毎回の試験では ZDEC を標準物質として同時に実施することにより, 試験法の感度と再現性を確かめた。Table.2 には毎年の ZDEC の IC50 値を示した。その結果, 変動が少なくほぼ一定の値が得られることから, IC50 値から判断する試験物質のクラス分けが各年度とも同一の基準でされていることが確認できた。我々はこれまで, 350 µg/ml 以上の IC50 値を示す

Table.2 Reproducibility of IC50 value for zinc diethyldithiocarbamate

Experimental year	IC50 ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}
1997	1.77
1998	1.62
1999	1.51
2000	1.73
2001	1.23
2002	1.58
2003	1.93
2004	1.48
(Mean \pm SD)	1.60 \pm 0.21

^{a)} IC50 was the concentration that reduce the absorbance by 50% of control.

物質を弱い細胞毒性物質で眼刺激を起こす可能性がほとんどない、35～350 $\mu\text{g/ml}$ を中程度の細胞毒性物質として眼刺激性が誘発される可能性がある物質、35 $\mu\text{g/ml}$ 以下を強い細胞毒性物質で明らかな眼刺激性を起こす危険性があるとした⁴⁾。本研究でもこの判定基準をそのまま用いることにした。

試験物質はバイオサイド18種、可塑剤4種、ゴム加硫促進剤2種、ゴム老化防止剤4種、スコーチ防止剤1種、溶剤1種である (Table.1)。可塑剤と溶剤の細胞毒性強度は強くはなく、ゴム老化防止剤に用いられるものは添加される物質によって強度に大きな差があった。今回試験したxanthate系ゴム加硫促進剤はこれまで試験したcarbamate系と同様に強い細胞毒性を示すことがわかった。

近年、抗菌性をうたった家庭用品が多く出回っており、これらに使用される抗菌剤は日本防菌防黴学会によってまとめられている⁷⁾。こうした薬剤には農薬として用いられてきたものを用途転換したものも多く含まれる。そのため、使用対象・方法が変わることによって皮膚等との接触頻度が増え、健康被害が起こる可能性がある。こうしたことから抗菌剤を始めとしたバイオサイドの安全性について確認する必要性が強くなり、そのため、この期間の試験対象物質としてはバイオサイドが半分以上を占めた。バイオサイドは製品の微生物汚染を防ぐ薬剤を総称しており、欧州では消毒剤、防腐剤、生物抑制剤、その他の4つの分類に分けており、さらに木材、繊維、ポリマー等防腐対象とするものによって小分類されている⁸⁾。日本では、防かび剤 (木材用、その他)、防腐剤、防藻防かび剤、抗菌剤、防虫忌避剤等で使われる物質が相当するが、1つの化学物質が複数の効果を示したり、使用先が多岐にわたったりすることから、ここではバイオサイドでまとめて記載した (Table.1)。最も強いものはzinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)、別名ジンクピリチオンで、シャンプーなどにふけ防止剤として使用されている。以下、TPN、TCMSPと続くものの、試験したほと

んどのバイオサイドがstrongと判定された。殺菌性ということ考えるとある程度強い細胞毒性を示すことは予想できる。一方、TCMTBは最もIC50値が低く、TCCも細胞毒性は弱かった。IC50値から判断するとバイオサイドのほとんどが眼刺激性を起こす可能性が高いとした。

National Institute for Occupational Safety and HealthのRegistry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) で各バイオサイドの実験動物に対する眼刺激性を調査したところ、PCMXは100 mgでmoderateの反応が表れたとしている⁹⁾。しかし、細胞毒性試験で最も毒性の弱かったTCMTBTは30%含有物100 mgでmoderateとの反応を示し、in vitro試験との相違が認められた。ZPTとBNPDは投与量については記載があるが反応性の報告はなかった。他の物質についてはin vivo眼刺激性データを示す報告は認めなかった。本細胞毒性試験法と皮膚刺激性との間に相関性はほとんどないが⁴⁾、動物実験での皮膚刺激性について参考に調べたところ、BNPD、BIT及びTMTBTはmild～moderateと判定され、OBTAはモルモットに対し連続塗布したところ、severeな反応を示したとある⁹⁾。Draize試験は実験者によって適用量が違うこと、1用量だけの試験で表れた反応強度だけをもとにしている場合がほとんどであり、このような用量反応関係を示さない試験での刺激性強度の判定を細胞毒性試験の結果と単純に比較するのは難しいのかもしれない。

欧州は、バイオサイド製品の上市に関する指令を採択し、抗菌剤の統一した法律管理をとることとし、既存化学物質の調査を行った後、審査対象物質を選定し、安全性試験のデータの提出を求めている^{8, 10-12)}。我が国でも繊維業界等では使用できる抗菌剤の表示と加工について自主基準が作られているものもあるが¹³⁻¹⁶⁾、多くの物質は家庭用品について適用した場合の安全性についてはほとんど検討されていない。ここで示したように、使用されるバイオサイドには強い細胞毒性を起こすものがあり、使用法の制限、配合量と溶出量との相関性など、これからも健康被害を防止するための検討が必要と思われる。

文 献

- 1) Borenfreund, E., Puerner, J.A.: *Toxicol. Lett.*, **24**, 119-124 (1985)
- 2) Draize, J.H., Woodward, G., Carvery, H.O.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390 (1994)
- 3) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: *J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.*, **12**, 15-24 (1993)
- 4) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 130-134 (1997)

- 5) Watanabe, M., Watanabe, K., Suzuki, K., Nikaido, O., Ishii, I., Konishi, H., Tanaka, N., Sugahara, T.: *Toxicol. In Vitro*, **3**, 329-334 (1989)
- 6) 厚生省薬務局医療機器開発課監修：医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説，薬事日報社（1996）
- 7) 日本防菌防黴学会編．防菌防黴剤事典－原体編－．防菌防黴，26増（1998）
- 8) Commission Regulation (EC) No 2032/2003 of 4 November 2003 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council on biocidal products on the market, and amending Regulation (EC) No 1896/2000. Official Journal of the European Communities L307, 24. 11. 2003, 2003, p.1-96
- 9) National Institute for Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)
- 10) Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. Official Journal of the European Communities L123, 24.4.98, 1998, p.1-63
- 11) Commission Regulation (EC) No 1896/2000 of 7 September 2000 on the first phase of the programme referred to in article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council on biocidal products. Official Journal of the European Communities L228, 8.9.2000, 2000, p.6-17
- 12) European Commission. First composite report in accordance with Article 24 of Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market covering the period May 2000 to November 2004. 22. 10. 2004
- 13) 財団法人日本環境協会エコマーク事務局．エコマーク認定における抗菌剤の取扱いについて（2003）
<http://www.jeas.or.jp/ecomark/tebiki22.html>
- 14) 社団法人日本塗料工業会．抗菌塗料製品管理のためのガイドライン（2003）
www.toryo.or.jp/jp/anzen/news/guide.pdf
- 15) 社団法人繊維評価技術協議会．抗菌防臭加工繊維製品認証基準（2003）
<http://www.sengikyo.or.jp/seihin/pdf/koukin.pdf>
- 16) 抗菌製品技術協議会．抗菌製品技術協議会会則 諸規定6. 品質と安全性に関する自主規格（2003）

Determination of Benzo[*a*]pyrene, Benz[*a*]anthracene and Dibenz[*a,h*]anthracene in Creosotes and Creosote-Treated Woods

Yoshiaki Ikarashi,* Masa-aki Kaniwa, and Toshie Tsuchiya

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received June 10, 2005; Accepted June 30, 2005)

The amount of benzo[*a*]pyrene (BaP), benz[*a*]anthracene (BaA), and dibenz[*a,h*]anthracene (DBA) has been restricted to a concentration of 10 $\mu\text{g/g}$ each in creosotes, and 3 $\mu\text{g/g}$ each in creosote-treated woods, respectively, because of the possibility of the risk of skin cancer in consumers, and creosotes can otherwise contain high concentrations of each chemical. We already reported the content of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenols in creosotes and creosote-treated wood as determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and absorptiometry [*Chemosphere*, 60, 1279–1287 (2005)]. However, the limit of determination of each PAH per sample was $> 40 \mu\text{g/g}$ according to that method, the sensitivity of which was insufficient for determining the allowable levels of these 3 compounds. Moreover, a substantial amount of time was needed for GC-MS analysis. In the present study, we improved upon our previous analytical method in order to increase the sensitivity of the test and to reduce the duration of GC-MS analysis. Creosote was extracted from treated wood samples by dichloromethane-soak incubation, and was placed on a Sep-Pak silica cartridge and eluted with dichloromethane. The eluates were evaporated and dissolved in dichloromethane. The sample solution spiked with the internal standard solution was injected into the GC-MS system. The limit of determination of each chemical in the test solution was approximately 0.2 $\mu\text{g/ml}$, which corresponded to 1–2 $\mu\text{g/g}$ in each sample. The duration of GC-MS analysis was approximately 17 min. A collaborative study was also carried

out in order to evaluate the reproducibility of the method for determining low levels of BaP and related compounds in creosotes. The present method was applied for the analysis of certain commercially available creosotes and creosote-treated wood samples in Japan. It was confirmed that some creosotes and railway sleepers contained these compounds in high concentrations, thus exceeding the allowed control value.

Key words — polycyclic aromatic hydrocarbon, creosote, benzo[*a*]pyrene, GC-MS, wood preservative

INTRODUCTION

Creosote is a mid-heavy distillate of coal tar.¹⁾ The majority of the creosote produced to date has been used as raw material for carbon black, while much of the remainder has been used as a wood preservative [The Japan Aromatic Industry Association, Inc., <http://www.jaia-aroma.com/>, Japan Wood Preserving Association (JWPA), <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jwpa/>]. Wood treated with creosote was formerly used for railway sleepers and poles for the transport of electricity, but creosote-treated wood is now commonly used for the foundations of buildings, fences, and stakes for agricultural use, and also for the manufacture of garden furniture and outdoor recreational facilities in parks. However, direct contact with creosote can lead to skin irritation and disease,^{2,3)} and is likely to be carcinogenic in humans; creosote is therefore classified as belonging to Group 2A among potential human carcinogens, as established by the International Agency for Research on Cancer (IARC).⁴⁾ Creosote contains high quantities (up to 85%) of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs),¹⁾ and the U.S. Environment Protection Agency (U.S. EPA) has defined 16 PAHs as priority pollutants.⁵⁾ Benzo[*a*]pyrene (BaP) is one of the most thoroughly investigated PAHs, and is classified as belonging to Group 2A among potential human carcinogens.⁶⁾ Therefore, BaP has been chosen as a marker for creosote treatment and is taken as an indicator for the toxicity of creosote. The Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment reported that the cancer risk from exposure to creosote is greater than previously thought.⁷⁾ Such concerns have led to a new Directive (2001/90/EC) that was adopted by the European Council,⁸⁾ according to which creosote that contains BaP at a concentration of higher than 0.005% (50 $\mu\text{g/g}$) by mass, as well as water-extractable phenols at a concentration

*To whom correspondence should be addressed: Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81-3-3700-1141; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

of higher than 3% by mass, may not be used in the treatment of wood; moreover, wood treated in such a manner may no longer be placed on the market. Each country in the European Union (EU) has thus been restricting the use of creosote since 2003.

In Japan, the recycling of disused railway sleepers as exterior wood for use in gardens has recently become popular. Disused railway sleepers imported from other countries and/or new exterior wood products have been sold at retail stores that deal in carpenter's tools and gardening supplies. Consequently, the opportunity to come into contact with creosote is increasing among the general public in Japan. In our monitoring study, more than 50 $\mu\text{g/g}$ of BaP was found in creosote and creosote-treated wood products available on the market in Japan.⁹⁾ To reduce the health risk posed by creosote, the Ministry of Health, Labour and Welfare decided to restrict the use of creosotes containing elevated amounts of carcinogenic PAHs. The health risks were estimated on the basis of the opportunity and time that a child could come into contact with creosote containing BaP in Japan. Based on these considerations, the amount of BaP was restricted to the following concentrations: 10 $\mu\text{g/g}$ in creosotes and 3 $\mu\text{g/g}$ in creosote-treated woods. Both benz[*a*]anthracene (BaA) and dibenz[*a,h*]anthracene (DBA) are also classified as belonging to Group 2A, due to their carcinogenic potential. The amount of DBA is lower than that of BaP in creosote, but DBA has a similar toxic equivalency factor relative to that of BaP.¹⁰⁻¹²⁾ The toxicity of BaA is not as great as that of BaP, but the amount of BaA in creosotes has been reported to be several times higher than that of BaP.⁹⁾ Therefore, the amount of these 2 PAHs are also restricted to the same level as that of BaP in creosotes. Creosotes that are commercially available in Japan undergo alkaline treatment after distillation (personal communication with a manufacturer), such that the content of water-extractable phenols is slight, relative to the EU control value.⁹⁾ It is therefore not considered important to measure and restrict the content of the phenols in creosotes manufactured in Japan.

The purpose of this study was to improve our previous analytical method⁹⁾ for the simultaneous determination of low levels of various PAHs (primarily BaP, BaA, and DBA) in creosotes and creosote-treated woods. Bestari *et al.* investigated the PAH content in wood products and the leaching behavior of creosote-treated wood by high-performance liquid chromatography (HPLC).¹³⁾ Anklam *et al.* used

a HPLC system equipped with a fluorescence detector for the determination of the BaP content in creosotes.¹⁴⁾ HPLC determination is sensitive to PAHs, but the identification of individual PAHs by comparison of their retention time is less accurate than the use of gas chromatography (GC); furthermore, it remains difficult to detect 3 PAHs simultaneously when using fluorescence HPLC. A GC system equipped with a capillary column and mass selective-ion-monitoring (SIM) is useful for detecting each chemical selectively and provides sufficient separation for the quantification of the PAHs in a complex.¹⁵⁻²²⁾ Therefore, we used GC-mass spectrometry (GC-MS) for the determination of PAHs in creosotes. With our previous method, the sensitivity of detection was low with respect to the determination of 3–10 $\mu\text{g/g}$ of PAHs in creosote and creosote-treated wood products,⁹⁾ and a long period of time was required for GC-MS analysis, *i.e.*, more than 30 min per sample. Therefore, we adopted an evaporation-concentration step and changed the column temperature conditions in order to increase the sensitivity of testing and to reduce the amount of time needed to perform GC-MS.

MATERIALS AND METHODS

Samples — Four commercially available creosotes (Nos. 1–4) and non-creosote type (creosote-alternative) oil-based wood preservative paints were purchased from stores in Tokyo Metropolis, and in Gumma and Kagawa prefectures. Four creosotes (Nos. 5–8) were provided by the Japan Aromatic Industry Association, Inc. (JAIA). The three trial products used for the collaborative study (codes A–C) were supplied by a manufacturer. Three new creosote-treated wood products were supplied by the Japan Wood Preservers Industry Association (JWPPIA). The JWPPIA reported that two of the products (samples B and C) were Kempas, those were used for railway sleepers. The other sample was Japanese hemlock, which was used for building foundations (sample A). Two previously used railway sleepers (samples D and E) that had been treated by creosote penetration and were imported for use in gardening were also purchased. One of these samples was pine wood. Sample F was a brand-new wooden stake made with Japanese cedar, the surface of which was painted with creosote.

Chemicals — An EPA PAH mixture containing acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, BaA,

benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*ghi*]perylene, BaP, chrysene, DBA, fluoranthene, fluorene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, naphthalene, phenanthrene, and pyrene at a concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$ in dichloromethane : benzene (1 : 1) (Spelco, U.S.A.) was used as a standard for the PAHs. The PAH standard mixture was diluted with dichloromethane to reach a final concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. Acenaphthene-d10, chrysene-d12, and phenanthrene-d10 (Spelco, or Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) were obtained as an internal standard for the determination of PAH levels. Each internal standard was dissolved in dichloromethane at concentrations of 5–20 $\mu\text{g/ml}$. All of the other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan.

Instruments — A gas chromatograph (Hewlett-Packard GC5890 Series II Plus) connected to a JEOL JMS-AM II 20 mass spectrometer was used for the analysis of the individual PAHs. System control and data processing were performed using the JEOL Automass II program (JEOL Datum). The column was a PTE™-5 fused silica capillary column (30 m in length and 0.25 mm i.d. coated with a 0.2 μm thickness of 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane film, Spelco). Sep-Pak Plus silica-cartridges (Part No. WAT020520) for solid phase extraction were obtained from the Waters Corporation (U.S.A.).

Extraction — For the creosote oils, the weight (g) of a 0.5 ml sample was measured in advance. The Sep-Pak Plus silica-cartridge was conditioned using 10 ml of dichloromethane. Then, 0.5 ml of the sample was loaded onto the cartridge and was eluted with 10 ml of dichloromethane into a round-bottomed flask. The eluate was evaporated to approximately 2 ml under reduced pressure.

For extraction from the wood products, a section of approximately 2 cm in depth from the surface of the sample was removed, and that section was further cut into small pieces of *ca.* 2–3 mm wide and 2 cm long. A portion of the 1.0 g fragment was placed into a screw-capped glass tube. After the addition of 20 ml of dichloromethane, the tube was incubated for 24 hr at 37°C. The extract was filtered off and collected into a round-bottomed flask. The wood sample and tube were washed with a small amount of dichloromethane. The combined eluate was evaporated under reduced pressure. The concentrated eluate was loaded onto a Sep-Pak Plus silica-cartridge and eluted with 10 ml of dichloromethane from the cartridge into a flask. The eluate was then concentrated to a volume of approxi-

mately 2 ml by evaporation.

GC-MS Determination — The total volume of the extract solution was adjusted to 5 ml with dichloromethane. For the determination of a high quantity of PAHs over the range of a calibration curve, a series of diluted sample solutions (1 ×, 20 ×, 100 ×, 500 ×, and 1000 ×) was prepared with dichloromethane. Two ml of each (diluted) extraction solution was obtained and spiked with 0.5 ml of the internal standard solution (*e.g.*, chrysene-d12 20 μg in dichloromethane), and the sample solution (1 μl) was injected into the GC-MS system in a splitless manner. The GC column temperature was programmed as follows: the column was first maintained at 60°C for 2 min and was then heated at a rate of 25°C/min to 300°C, after which it was held at this temperature for 6 min. The injection temperature was maintained at 280°C. The GC-MS transfer line temperature was 280°C, and the ion source temperature was 180°C. The carrier gas was helium and the column flow was maintained at 1.0 ml/min. The MS electron impact ionization energy was 70 eV. Detection was carried out using a total scan, (TIC) $m/z = 45\text{--}500$, and SIM. The individual m/z values for each compound are shown in Table 1. The PAH standard solutions (*e.g.*, 0.5, 1, 2, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$) spiked with 0.5 ml of the internal standard solution were injected into the system, and the calibration curves for the ratio of the peak area of each PAH to the internal standard for the respective mass of each ion were established. Compounds in the sample solutions were identified based on their retention times and on the basis of agreement with the mass chromatograms of the PAH standard solutions using a BenchTop/PBM Mass Spectral Identification system (Palisade Co., U.S.A.) with the Wiley Registry of Mass Spectral Data (John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.). Each PAH concentration ($\mu\text{g/ml}$) in an appropriate diluted sample solution was derived from the calibration curves, and then the levels of the PAHs (μg) per 1 g of sample were derived.

RESULTS AND DISCUSSION

GC Conditions

GC-MS is the method of choice for conducting analyses of water and soil in the U.S. EPA.¹⁶⁾ A column with a film of 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane gives excellent separation of 16 PAHs, so we used a PTE™-5 column of this type. In our previous study, the column was heated at a rate of

Table 1. PAHs Covered in this Study

Peak No.	Compound	CAS No.	Molecular formula	Ion for quantification (m/e)	GC retention time (min)	IARC cancer risk	Determination	Regulation
1	Naphthalene	91-20-3	C ₁₀ H ₈	128	5.59			
2	Acenaphthylene	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152	7.35			
IS1	Acenaphthene-d10		C ₁₂ H ₁₀	164	7.44			
3	Acenaphthene	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154	7.45			
4	Fluorene	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166	8.16	3		
IS2	Phenanthrene-d10		C ₁₄ H ₁₀	188	9.11			
5	Phenanthrene	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	178	9.12	3		
6	Anthracene	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178	9.15	3		
7	Fluoranthene	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202	10.23	3		
8	Pyrene	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202	10.36	3		
9	Benz[<i>a</i>]anthracene	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228	11.47	2A	<i>a</i>)	<i>b</i>)
IS3	Chrysene-d12		C ₁₈ H ₁₂	240	11.47			
10	Chrysene	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228	11.49	3	<i>a</i>)	
11	Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252	13.02	2B	<i>a</i>)	
12	Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252	13.04	2B	<i>a</i>)	
13	Benzo[<i>a</i>]pyrene	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252	13.30	2A	<i>a</i>)	<i>b</i>)
14	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276	15.33	2B	<i>a</i>)	
15	Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278	15.36	2A	<i>a</i>)	<i>b</i>)
16	Benzo[<i>ghi</i>]perylene	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	276	16.06	3	<i>a</i>)	

a) Compounds determined in this study. *b*) Concentration of the compounds in creosotes was regulated in Japan.

10°C/min, and the duration of analysis of 16 PAHs exceeded 30 min per sample.⁹⁾ In the present study, we changed the temperature rate to 25°C/min in order to reduce the duration of the analysis. The final temperature was set at 300°C, as based on the separation of indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, DBA, and benzo[*ghi*]perylene. The retention time and quantitative ion mass of each PAH is shown in Table 1 under the present conditions. The GC-MS analytical time was reduced from > 30 to 17 min.

The calibration curve for the ratio of the peak area of each PAH to the internal standard (*e.g.*, chrysene-d12) for the respective mass of each ion was established, and each PAH concentration was derived from the calibration curve. The linear calibration curve for each PAH was obtained within the range of 0.2 and 5 µg/ml. The correlative coefficients of BaA, BaP, and DBA were 0.9984, 0.9961, and 0.9983, respectively. The limit of the quantity of these compounds in the injection solution was considered as 0.2 µg/ml, *i.e.*, the lowest concentration used for the linear calibration curve.

Solid Phase Extraction

Column chromatography is generally used to separate PAHs from various other chemicals in creosote.^{15,18,21)} Here, target PAHs were separated by a

solid phase extraction approach using Sep-Pak Plus silica-cartridges. A PAH standard solution (10–20 µg in 0.1 ml) was loaded onto the cartridge, and then was eluted with 10 ml of dichloromethane. The recovery of PAHs in this fraction was 94.4–97.8%. In the next eluate with 10 ml dichloromethane, no PAH was detected. A similar recovery test was carried out using creosote, and a high yield of PAHs was eluted from the cartridge (data not shown). Solid phase extraction with dichloromethane was found to be efficient for separating the PAHs contained in creosote.

Extraction of PAHs

In this study, we first compared the efficiency of the solvents (*i.e.*, dichloromethane, methanol, hexane, and saline) on the extraction of PAHs from creosote-treated woods. A higher concentration of PAHs was detected in the extracts with dichloromethane than in those with hexane, methanol, and saline (Table 2). The dichloromethane extract could be loaded directly onto the Sep-Pak Plus silica cartridges, and was eluted with dichloromethane. Therefore, we found that dichloromethane was a suitable solvent for the extraction of PAHs from creosote-treated wood.

Soxhlet-extraction techniques have generally

Table 2. Comparison of Extraction Solvent on Recovery of PAHs from Creosote-Treated Wood Product

Compound	Amount detected ($\mu\text{g/g}$)			
	Dichloromethane	Methanol	Hexane	Saline
Naphtalene	295	81	9	0
Acenaphthylene	173	28	11	1
Acenaphthene	4854	1496	639	3
Fluorene	4385	1250	685	4
Phenanthrene	17578	5680	2749	6
Anthracene	4728	1590	1146	2
Fluoranthene	6406	2397	1097	4
Pyrene	4494	1613	762	4
Benz[<i>a</i>]anthracene	1019	315	131	4
Chrysene	976	291	131	3
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	558	106	38	2
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	382	71	26	2
Benzo[<i>a</i>]pyrene	380	82	25	0
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	157	45	17	0
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	134	24	18	0
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	152	32	9	0

Sample (1.0 g) was extracted with 20 ml of each solvent at 37°C for 24 hr. In the case of saline, the water layer was used, and liquid-liquid extraction was performed by shaking with dichloromethane. The extract was loaded onto a Sep-pak silica cartridge, and was eluted with 10 ml of dichloromethane. The fraction was diluted with dichloromethane to the appropriate concentration, and injected into GC-MS.

been used for the extraction of creosote-treated wood, but such an approach requires long extraction periods and is unsuitable for processing large numbers of samples. Some groups have reported that mechanical shaking and liquid extraction methods are also useful, as is Soxhlet extraction.^{13,15,18,21,22} Our group also previously confirmed the usefulness of soak-extraction for the analysis of wood samples.⁹ Sonication is thought to enable the rapid extraction of PAHs. Here, we compared the potential usefulness of sonication and soaking for extraction of PAHs from wood samples. Dichloromethane (20 ml) was added to 1 g of creosote-treated wood, and extraction was carried out with sonication for 30 min at room temperature or with incubation for 24 hr at 37°C. After extraction by either soaking or sonication, both samples were once again subjected to extraction by soaking them in 20 ml of dichloromethane for 24 hr at 37°C. The concentrations of 8 PAHs extracted under both sets of conditions are shown in Table 3. The amount of PAH released by the soaking approach to extraction was higher than that detected by sonication extraction. Upon the second cycle of soaking extraction following sonication, a considerable amount of PAH was detected. This finding indicated that a large quantity of PAH remained in the wood, even after sonication; moreover, most of the PAH was released after a single

treatment by soaking extraction.

After the samples had been soaked, some amount of dichloromethane containing the PAHs remained in the wood, and thus complete extraction of PAHs was not considered possible. This issue may lead to a reduction in the recovery percentage, especially in cases involving a small quantity of PAHs. However, as noted above, the amount of extracted PAHs did not increase, even upon repetition of the soak extraction, and the PAHs not extracted from the wood under these conditions would not be expected to pose a health risk. We therefore chose the condition under which 1 g of sample would be incubated with 20 ml of dichloromethane for 24 hr at a temperature of 37°C for the extraction of PAHs.

In our previous study, the test solution that was extracted from the sample was not concentrated before injection into the GC-MS.⁹ For creosotes, 0.1 g of sample was diluted with 20 ml of dichloromethane, and the extract from 1 g of wood sample was diluted to a total volume of 25 ml. In addition, the elution of 3 target PAHs from the GC column was slow. The limit of determination of each PAH per sample was $> 40 \mu\text{g/g}$ according to that method. In the improved method, the eluate from the Sep-Pak Plus silica-cartridges was concentrated by evaporation before injection into the GC-MS. The eluate from 1 g of wood sample or 0.5 g of creosote was

Table 3. Amount of PAHs Extracted from Wood Product by Each Condition

Compound	Amount determined ($\mu\text{g/g}$)			
	Condition A		Condition B	
	(1) Incubation	(2) Incubation	(1) Sonication	(2) Incubation
Benz[<i>a</i>]anthracene	668	38	310	540
Chrysene	535	25	253	420
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	278	17	122	166
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	156	7	73	139
Benzo[<i>a</i>]pyrene	141	3	53	102
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	41	ND	29	22
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	12	ND	12	5
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	31	ND	23	16

One gram of wood sample was extracted with 20 ml dichloromethane by incubation for 24 hr at 37°C for condition A or sonication for 30 min at room temperature for condition B (1). After obtaining the solution, each sample was again extracted with the same volume of dichloromethane by incubation for 24 hr for condition A or 48 hr for condition B (2). The amount of PAHs in each extract was determined. Data are the average values of 2–3 experiments. ND means $< 1.0 \mu\text{g/g}$.

Table 4. Analytical Results of Trial Creosote Products Containing Low Concentrations of Regulated Compounds Performed in 4 Laboratories

Compound	Concentration ($\mu\text{g/g}$, mean \pm S.D., $n = 2-5$)			
	Laboratory 1	Laboratory 2	Laboratory 3	Laboratory 4
(a) Sample A				
Benz[<i>a</i>]anthracene	53.0 \pm 6.9	52.0 \pm 1.0	50.8 \pm 0.6	NT ^{a)}
Benzo[<i>a</i>]pyrene	29.7 \pm 5.4	29.0 \pm 0.5	30.9 \pm 0.3	36.4 \pm 0.8
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	6.5 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2	5.2 \pm 0.7	NT
(b) Sample B				
Benz[<i>a</i>]anthracene	18.0 \pm 0.9	15.0 \pm 0.4	14.5 \pm 0.8	NT
Benzo[<i>a</i>]pyrene	12.5 \pm 1.1	9.0 \pm 0.3	11.0 \pm 0.5	12.3 \pm 1.3
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	3.2 \pm 1.0	2.3 \pm 1.3	1.8 \pm 0.2	NT
(c) Sample C				
Benz[<i>a</i>]anthracene	5.9 \pm 0.2	6.0 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2	NT
Benzo[<i>a</i>]pyrene	3.9 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1	2.9 \pm 0.4	3.6 \pm 0.6
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	ND ^{b)}	ND	1.1 \pm 0.3	NT

a) NT = not tested. b) ND = not determined, $< 1.5 \mu\text{g/g}$.

adjusted to a total volume of 5 ml in solution before injection into the GC-MS. The peak height and area of each PAH observed in the GC chromatogram increased due to alteration of the column temperature. Therefore, the limit of determination of PAHs in the injection solution became $0.2 \mu\text{g/ml}$. As regards the amount in the creosote and creosote-treated samples, the limit of determination of 3 PAHs was 1 and $2 \mu\text{g/g}$, respectively.

Collaborative Study

In order to validate the method developed here, 3 creosotes containing different amounts of regulated chemicals were used, and these samples were

analyzed by three different laboratories in terms of their concentrations of BaP, BaA, and DBA; a fourth laboratory (Laboratory 4) measured only the BaP content of these samples. The experiment was repeated 2–5 times at each laboratory (Table 4). Sample A contained large amounts of BaA, BaP, and DBA in these 3 creosotes. The value of BaA at a concentration of $50.8-53.0 \mu\text{g/g}$ was higher than that of BaP. The present concentrations of BaP ($29.0-36.4 \mu\text{g/g}$) were allowable according to the EU control ($< 50 \mu\text{g/g}$), but they remained above the allowed value in Japan. As regards sample B, all laboratories reported similar levels for each compound. Sample C contained BaA, BaP, and DBA at concen-

Table 5. Amount of 8 PAHs in Creosotes and Creosote-Like Wood Preservatives

Compound	Amount ($\mu\text{g/g}$)							
	Creosote							
	Commercially available product				Product supplied from manufacturer			
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8
Benz[<i>a</i>]anthracene	38	1763	959	857	2714	2005	18	6052
Chrysene	31	1500	848	800	2312	1410	15	6600
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	20	556	414	543	1481	1441	4	4918
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	13	456	304	379	874	803	5	2184
Benzo[<i>a</i>]pyrene	16	363	280	368	1018	1122	4	2591
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	8	111	60	77	119	193	4	1257
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	2	33	11	12	199	188	4	442
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	8	106	55	70	72	113	4	1442

Compound	Amount ($\mu\text{g/g}$)			
	Creosote-like	Creosote		
	Commercially available product	Trial product		
	No. 9	Code A	Code B	Code C
Benz[<i>a</i>]anthracene	24	6	13	38
Chrysene	23	2	12	27
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	14	5	11	29
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	10	ND	6	14
Benzo[<i>a</i>]pyrene	13	2	8	28
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	5	ND	3	10
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	1	ND	2	4
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	6	ND	3	10

ND means $< 1.5 \mu\text{g/g}$.

trations of 4.8–6.0, 2.9–3.9, and 0 (*i.e.*, below the determination limit)–1.1 $\mu\text{g/g}$, respectively. All laboratories reported almost the same concentrations of PAHs in creosotes. Thus, the analytical method developed here appears to be sufficiently stable and can be used for the determination of low levels of BaA, BaP, and DBA.

Determination of PAHs in Creosote and Creosote-Treated Wood

The results of the analysis of 8 PAHs including BaA, BaP, and DBA in 8 creosotes (Nos. 1–8), 1 creosote-like (alternative) wood preservative (No. 9), and 3 creosotes used as trial products in the collaborative study (codes A–C) are shown in Table 5. These products were for sale and available to the general public for use in wood preservation prior to the introduction of the Japanese regulations. Among the carcinogenic PAHs classified as being associated with a cancer risk of 2A or 2B,⁶⁾ BaA was detected in the highest concentrations, varying between 18 and 6052 $\mu\text{g/g}$ in these creosotes. Isomers of benzofluorancenes and BaP were detected at simi-

lar levels. The respective amounts of indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, DBA, and benzo[*ghi*]perylene were low, compared to those of the other PAHs. The PAH profiles regarding the constituents and levels of creosotes in Japan were similar to those for the old type of creosotes used in the EU.^{17,18)} Improved creosotes, *i.e.*, those in which BaP amounts were reduced by the fractionation of lower boiling-temperature components, were used for the construction of wooden railroad ties in Switzerland.¹⁸⁾ Among the creosotes examined, both samples No. 1 and 7 contained BaP at levels of less than 50 $\mu\text{g/g}$, the allowable limit adopted for the EU regulations. The manufacturer reported that samples such as No. 7 have been produced for export to the EU by fractionating lower boiling components. Recently, the quality of the creosote that can be used as a wood preservative was revised for the Japanese Industrial Standard (JIS).²³⁾

Entirely different constituents were found in the wood preservative of the non-creosote type (No. 9), as shown in the total ion chromatogram of Fig. 1; in this sample, the amount of PAHs was low. The content of BaP was lower than the EU-sanctioned