

## Safety assessment of paper and board food packaging: Chemical analysis and genotoxicity of possible contaminants in packaging

ASAKO OZAKI<sup>1,2</sup>, YUKIHIKO YAMAGUCHI<sup>1</sup>, TADAO FUJITA<sup>1</sup>,  
KOICHI KURODA<sup>2</sup>, & GINJI ENDO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka, Japan, and <sup>2</sup>Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Osaka City University Medical School, Osaka, Japan

### Abstract

In order to identify potential genotoxicant(s) in recycled paperboard, samples were fractionated using multiple liquid/liquid extraction, and gel permeation chromatography, and analysed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry. The *rec*-assay was used as an indicator of genotoxicity. Genotoxicants in the recycled paperboard were identified as dehydroabietic acid (DHA) and abietic acid (AA). DHA and AA were detected in two out of five virgin products, and in all seven recycled products for food-contact use. Total amounts of DHA and AA were 240 and 990 µg/g in the virgin products and 200–990 µg/g in the recycled products. A good correlation was observed in the total amount of DHA and AA content determined in paper products and DNA-damaging activity. Moreover, genotoxic effects in paper products showed a good match with standard compounds, indicating that the genotoxic effects of these paper products was mostly attributable to DHA and AA.

**Keywords:** Paper, food packaging, recycling, dehydroabietic acid, abietic acid, *rec*-assay

### Introduction

Paper and board are widely used as food container and packaging materials, mainly for disposable products such as cups, dishes, papers towels and food boxes. Paper products are classified into virgin products, which are made from wood chips, and recycled products, which are made from recovered fiber. As this material is subjected to extensive treatment involving the use of inks, adhesives etc., various contaminants may be found in recycled products.

Sturaro et al. (1994) reported that diisopropyl-naphthalenes were found in cardboard packages, usually manufactured from recycled paper. Castle et al. (1997) reported that Michler's ketone (MK) and 4,4'-bis(diethylamino)benzophenone (DEAB), which can be used in UV-cured printing inks for cardboard, were detected in 26% and 4% of 121 paper and paperboard food packaging samples, respectively, and the most likely origin was the use

of recycled fibers. Sipiläinen-Malm et al. (1997) reported that a very broad variety of substances are present in fiber-based recycled materials, and some samples contained mutagenic or other toxic compounds. Vinggaard et al. (2000) reported that paper towels made of recycled paper contained high levels of bisphenol A (BPA), whereas virgin paper contained none or negligible amounts of BPA. Binderup et al. (2002) reported that significantly higher total amounts of chemicals were found in paper made from recycled fiber than that made from virgin-fiber pulp, indicating that only a few compounds originate from the virgin fiber.

Some toxicological studies on recycled paper have been published (Baba et al. 1998, Fauris et al. 1998, Binderup et al. 2002). Among these are reports that recycled paper exhibits higher in-vitro toxicity than virgin paper, however, the toxicant or toxicants have yet to be identified.

We previously examined the genotoxicity of 28 virgin and recycled products for food-contact use,

and demonstrated that more recycled than virgin products exhibited DNA-damaging activity (Ozaki et al. 2004). Chemical analysis revealed that recycled-paper products were characteristically contaminated by benzophenone, 4-dimethylamino-benzophenone, DEAB, MK, BPA and pentachlorophenol. However, the levels of these chemicals in the recycled paper products could not explain their genotoxic effects.

In the present study, in order to identify the genotoxicant(s) in recycled paper, the *rec*-assay was used as an indicator of genotoxicity and recycled paperboard was fractionated by multiple liquid/liquid extraction and gel permeation chromatography (GPC), and analysed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

## Materials and methods

### Materials

**Solvents and reagents.** Dehydroabietic acid (DHA) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), and abietic acid (AA) was purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Dimethyl sulfoxide (DMSO), ammonium acetate and organic solvents were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. or Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan). All organic solvents were of HPLC or residual pesticide analytical reagent grade.

**Samples.** Recycled paperboard (recycled fiber > 95%) was used for fractionation. To determine the correlations between contents of DHA and AA and genotoxicity of paper products, five virgin paper products and seven recycled paper products (including the paperboard) in food-contact use were used. The products were purchased at a supermarket in Japan between 2001 and 2004.

### Methods

**Rec-assay.** *Rec*-assay was performed according to the spore method of Kada et al. (1980). A recombination-less strain, M45 *Rec*<sup>-</sup>, and the wild strain H17 *Rec*<sup>+</sup> of *Bacillus subtilis* were used. The strains were kindly provided by the National Institute of Genetics, Japan. In brief, plates were prepared by adding to B-2 (10 g of beef extract, 10 g of polypeptone, 5 g of NaCl, 1000 ml of water; adjusted to pH 7.0) agar (1.5%)  $2 \times 10^5$  spores/ml of strain H17 and M45, preparing 10 ml of the resulting spore agar at 42°C, pouring it into a level plastic Petri dish (90 mm diameter), and allowing it to solidify well. A paper disc (8 mm diameter) was placed on the

surface, and then impregnated with 40 µl of the chemical or sample solution. After 24 h of incubation at 37°C, diameters of killing zone were measured. When a killing zone was larger in M45 *Rec*<sup>-</sup> than in H17 *Rec*<sup>+</sup>, the chemical or sample solution was concluded to cause DNA-damaging activity in *B. subtilis*. Recycled-paperboard solutions, at each step of the fractionation process, and methanol solutions of virgin- and recycled-paper products to determine the correlations between contents of DHA and AA and genotoxicity, were dried under a nitrogen stream and dissolved in DMSO. DHA and AA were dissolved in DMSO.

**Sample preparation for fractionation.** Recycled paperboard was cut into pieces (1 × 1 cm) and 10 g was placed in a flask and refluxed with 200 ml ethanol for 2 h. After filtration, the ethanol solution was evaporated and diluted to 2 ml with ethyl acetate. One ml of the solution was transferred to a separating funnel together with 19 ml of ethyl acetate and extracted with 20 ml of 0.01 M HCl solution. After the aqueous layer was discarded, the organic layer was extracted with 20 ml of saturated NaHCO<sub>3</sub> solution. The aqueous layer was again discarded and the organic layer was extracted with 20 ml of alkali buffer solution (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50.0 ml, 0.1 M NaOH 43.2 ml, water 6.8 ml, pH 12). The extract was then dehydrated with sodium sulfate, evaporated and diluted to 1 ml with methanol after discarding the aqueous layer. Sample cleaning was performed using a solid-phase extraction column. The column was a 6 ml tube column containing 500 mg of graphitized non-porous carbon (Envi-carb, Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA). The column was preconditioned by rinsing with 10 ml of methanol, after which 1 ml of the sample was added to the column and eluted with 9 ml methanol. The eluate was then evaporated and diluted to 1 ml with tetrahydrofuran. The resulting solution was then filtered and subjected to spectrophotometry and GPC.

**Spectrophotometry.** The paperboard extract was scanned from 190 to 800 nm using a Hitachi U-2000 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). Background absorbance was subtracted for each wavelength.

**Gel permeation chromatography (GPC).** The GPC system used consisted of a Waters 600E system controller, a Waters 717 autosampler, a Waters 486 tunable absorbance detector and a Waters fraction collector (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Chromatographic separate conditions were

as follows: Guard and analytical columns, Shodex GPC KF-G ( $10 \times 4.6$  mm i.d.,  $8 \mu\text{m}$  particle size) and KF-801 ( $300 \times 4.6$  mm i.d.,  $6 \mu\text{m}$  particle size,  $20 \text{ \AA}$  pore size) (Showa Denko K. K., Tokyo, Japan); oven temperature, ambient; mobile phase, tetrahydrofuran; flow rate, 1 ml/min; injection volume,  $50 \mu\text{l}$ ; ultraviolet detection, 254 nm. The paperboard sample was fractionated every 30 s. Polystyrene standards (Shodex standard SL-105, Showa Denko K. K.), benzene and *n*-propylbenzene were used as calibration standards for GPC.

*Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).* Chromatographic analysis was performed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a 5973 mass-selective detector. GC conditions were as follows: Column, HP-1MS (100% dimethylpolysiloxane,  $0.25$  mm i.d.  $\times$   $30$  m, film thickness  $0.25 \mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Inc.); oven temperature held at  $50^\circ\text{C}$  for 2 min, then raised at  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  to  $280^\circ\text{C}$  and held for 5 min; injection temperature,  $280^\circ\text{C}$ ; carrier gas, He at 1 ml/min; injection volume,  $1 \mu\text{l}$  (splitless). MS conditions were as follows: Electron impact ionization mode; ion source voltage, 70 eV; ion source temperature,  $220^\circ\text{C}$ . The mass spectrometer was scanned over the range  $m/z$  50 to 500. Qualitative identification of the detected compounds was done using the NIST Library (National Institute of Standards and Technology, Mass Spectral Library).

*Sample preparation to determine the correlations between contents of DHA and AA and genotoxicity.* Printed surfaces of the paper and paperboard were peeled off to exclude the influence of the inks used in printing. Five gram was refluxed with 100 ml ethanol. After filtration, the ethanol solution was evaporated and diluted to 5 ml with methanol. For *rec*-assay, 1 ml of the methanol solution was dried under a nitrogen stream and dissolved in  $100 \mu\text{l}$  DMSO. For LC/MS analysis, 1 ml of the methanol solution was diluted to 10 ml with mobile phase of LC/MS, and 1 ml of this solution was diluted to 10 ml with mobile phase. After the solution was filtered, it was subjected to LC/MS analysis.

*Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).* Chromatographic analysis was performed according to the method of McMartin et al. (2002), slightly changed, using a Hewlett-Packard 1100 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Inc.) equipped with an API 2000 mass spectrometer equipped with an electrospray ionization interface (ESI) operating in negative-ion mode (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). LC conditions were as follows: Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 ( $150 \times 2.1$  mm i.d.,  $5 \mu\text{m}$  particle size, Agilent Technologies Inc.); oven temperature held at  $30^\circ\text{C}$ ; mobile phase, 50 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (2:8); flow rate, 0.2 ml/min; injection volume,  $10 \mu\text{l}$ . MS conditions were as follows: Ion spray voltage,  $-3800$  V; ion source temperature,  $550^\circ\text{C}$ ; declustering potential,  $-66$  V; focusing potential,  $-330$  V for DHA,  $-200$  V for AA; entrance potential,  $-10$  V for DHA,  $-4.5$  V for AA. Quantitative analysis was performed using selected ion monitoring of  $m/z$  299.1 for DHA and  $m/z$  301.2 for AA. Measurement was carried out using the respective calibration curves, ranging from 0.1 to 100 ng for DHA and AA.

## Results

### *DNA-damaging activity of liquid/liquid extracted fractions of recycled paperboard*

DNA-damaging activity was investigated by *rec*-assay at each step of the fractionation process. DNA-damaging activity was detected in the organic layer following the extraction of paperboard solution with 0.01 M HCl solution. The organic layer was then extracted with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution, and DNA-damaging activity was detected in the organic layer. Next, the organic layer was extracted with alkali buffer solution and DNA-damaging activity was again detected in the organic layer, indicating the genotoxicant(s) to be a neutral compound(s). DNA-damaging activity in the organic layer was unchanged throughout the extraction process, and remained so after applying the solution to an Envi-carb cartridge for clean-up.

*Spectrophotometry.* The fraction obtained from liquid/liquid extraction was subjected to spectrophotometric analysis. The absorbance was determined to be between 200 and 800 nm, and the absorption maximum was between 210 and 250 nm.

*GPC.* Also known as size exclusion chromatography, GPC is a method of characterizing molecular weight. The fraction obtained from liquid/liquid extraction was fractionated every 30 s and DNA-damaging activity was investigated. One peak was shown in the chromatogram and fractions around this exhibited DNA-damaging activity (Figure 1). The molecular weight of the genotoxicant(s) was estimated to be 150–350 daltons from the calibration standards.

*GC/MS.* The fractions that showed DNA-damaging activity in GPC were subjected to GC/MS analysis. A

total ion chromatogram is shown in Figure 1. Two large peaks, two medium peaks, and several small peaks were detected. Qualitative identification of these peaks was carried out using the NIST Library, and three peaks were identified as dibutylphthalate, oleic acid and di(2-ethylhexyl)phthalate. The biggest peak was identified as DHA, and small peaks in its vicinity had a similar structural formula. Mass spectra and retention time of the biggest peak, indicated to be DHA by NIST Library, were compared with a standard solution of DHA (see Figure 2). The relatively large peak, which showed  $m/z$  302 and remained unidentified using the NIST Library, was identified as abietic acid (AA), a compound related to DHA (Figure 2).

*LC/MS.* Since DHA and AA are too polar and not suitable for GC analysis, LC/ESI/MS was used for their determination. Levels of DHA and AA in the

virgin and recycled paper and paperboard products are shown in Table I. DHA and AA were detected in two out of five virgin products and in all recycled products. Total amounts of DHA and AA were 240 and 990  $\mu\text{g/g}$  in virgin products and 200–990  $\mu\text{g/g}$  in recycled products. Mass chromatograms of standard solution and recycled food box (sample no. 5) are shown in Figure 3.

*Rec-assay.* Results of the *rec*-assay for DHA and AA are shown in Figure 4. DHA and AA produced killing zones in a linear manner in both the M45 *Rec*<sup>-</sup> and H17 *Rec*<sup>+</sup> strains. Furthermore, the killing zone of M45 *Rec*<sup>-</sup> was larger than that of H17 *Rec*<sup>+</sup>. A difference between the killing zone of H17 *Rec*<sup>+</sup> and M45 *Rec*<sup>-</sup> strains more than 2 mm in one dose is considered to indicate DNA-damaging activity (Kada et al. 1980). In our study, killing zones were all clear and measured accurately with an error below

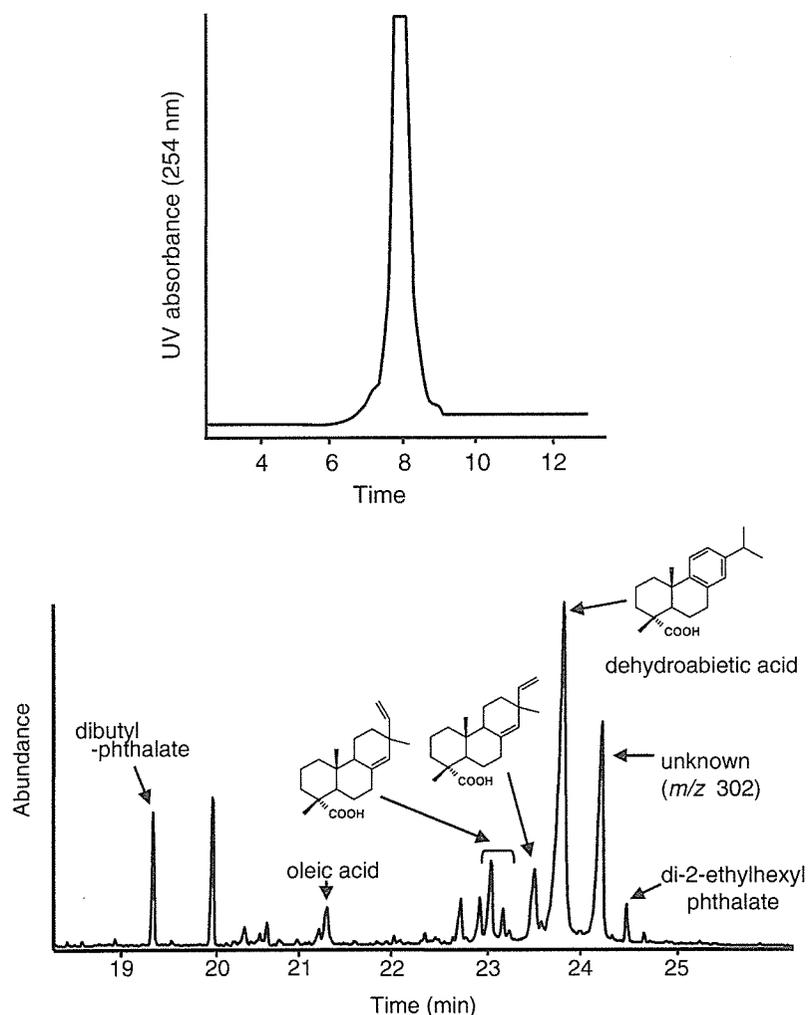


Figure 1. Gel permeation chromatogram of recycled paperboard fractionated by liquid/liquid extraction (above) and GC/MS total ion chromatogram fractionated by GPC (below). Peaks were identified by NIST library.

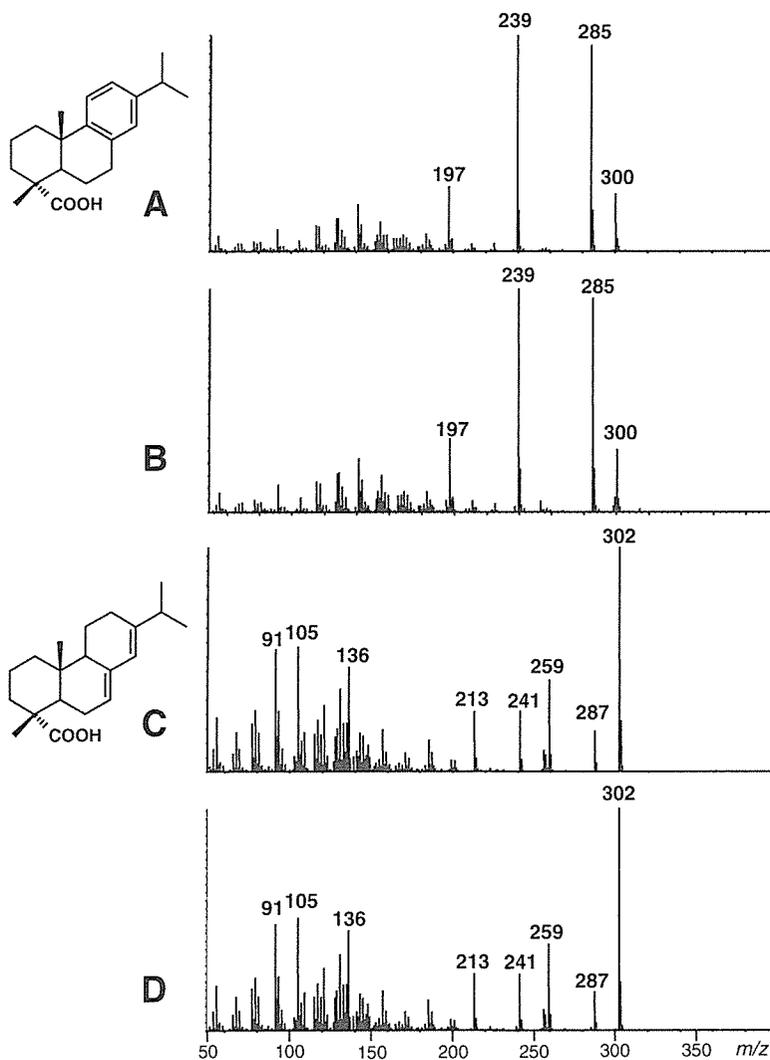


Figure 2. Mass spectra of DHA in standard solution (A) and recycled paperboard (B), AA in standard solution (C) and recycled paperboard (D).

Table I. Levels of DHA and AA in virgin and recycled paper and paperboard for food packaging.

Product	Coffee filter		Dish		Tissue		
	1	2	3	4	5		
Virgin-paper products ( $\mu\text{g/g}$ )							
DHA	ND	ND	77	38	ND		
AA	ND	ND	910	200	ND		
DHA + AA	-	-	990	240	-		
Product	Cardboard box		Food box			Newspaper	Paperboard
	1	2	3	4	5	6	7
Recycled-paper products ( $\mu\text{g/g}$ )							
DHA	170	59	53	370	67	210	140
AA	580	380	150	620	840	590	370
DHA + AA	750	440	200	990	910	800	510

DHA: dehydroabietic acid.

AA: abietic acid.

ND: not detected; less than 1.0  $\mu\text{g/g}$ .

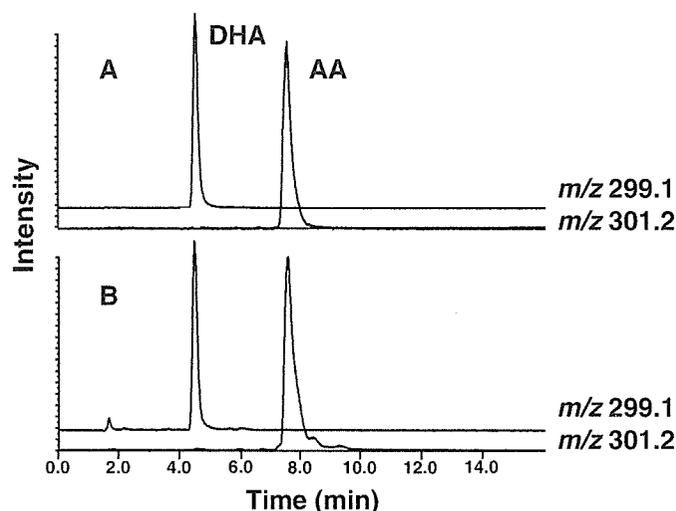


Figure 3. Mass chromatograms of DHA and AA in standard solution (A) and recycled food box (sample no. 5) (B).

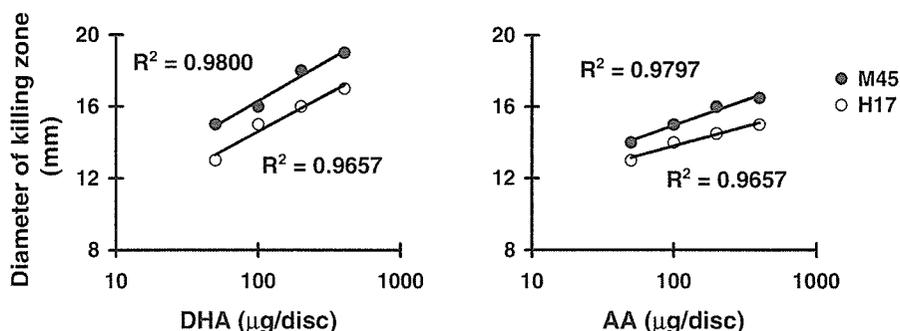


Figure 4. *Rec*-assay of DHA and AA.

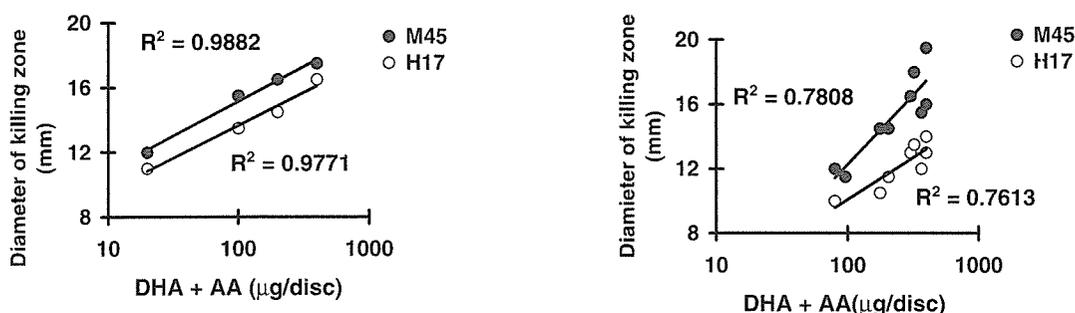


Figure 5. *Rec*-assay of DHA and AA mixture. DHA and AA were mixed in equal amounts.

Figure 6. Correlations between the total amount of DHA and AA in virgin and recycled paper products and the diameter of the killing zone exhibited in the *rec*-assay.

1 mm. Chemicals were tested in four doses and the killing zones of M45 *Rec*<sup>-</sup> strains were always larger than those of H17 *Rec*<sup>+</sup> by 1 mm and the chemicals were considered to indicate DNA-damaging activity. The activity of AA was slightly lower than DHA. Since the toxicity of compounds may be enhanced or decreased when combined, equal amounts of DHA and AA was mixed and tested. As shown in Figure 5,

there was no significant difference between the DHA and AA mixture, DHA only or AA only, indicating that genotoxic effects of DHA and AA are additive. Figure 6 shows the relationship between the total amounts of DHA and AA content determined in paper products and the diameters of killing zones exhibited. Good correlation was observed in both the

M45 and H17 strains and the genotoxic effects in paper products also showed a good match with standard compounds, indicating that the genotoxic effects of the paper products was mostly attributable to DHA and AA. There was small difference in the slope of M45 and H17 strains. Tested paper products have not cleaned up by such as liquid/liquid extraction or GPC, so various kinds of unknown chemicals are included in. As M45 strain is more sensitive to genotoxicants than H17 strain, the difference in the slope may be caused by these various unknown chemicals in the paper extracts. Moreover, the difference of the diffusion speed in the agar medium of DHA and AA might cause the difference in the slope. Three virgin paper products, which contained neither DHA nor AA, showed no or negligible killing zones.

### Discussion

We performed multiple fractionations of recycled paperboard and found the genotoxicants to be DHA and AA. From the liquid/liquid extraction, it was indicated that the genotoxicant(s) might be a neutral compound(s). DHA and AA are tricyclic and their solubility in water are not so high (DHA 6.6, AA 4.3 mg/l, pH 7) (Liss et al. 1997). Moreover, the pKa of DHA and AA are 5.7 and 6.4 (Liss et al. 1997), respectively, and they are therefore almost neutral. DHA and AA were detected in all recycled products, and a good correlation was obtained between DHA and AA contents and DNA-damaging activity. DHA and AA are resin acids that are major toxicants in pulp and paper mill effluents. Several researchers have linked between 20% and 70% of the toxicity of untreated effluents to resin acids (Zanella, 1983, Volkman et al. 1993, Wang et al. 1995). Resin acids found in rosin are generally of the abietic and pimaric types. DHA and AA are major acids of the abietic type found in different types of rosin and are primary sources of toxicity in fish. AA is easily oxidized or degraded by bacteria or fungi producing DHA (Wang et al. 1995, Berg et al. 1998, Martin et al. 2000). Concentrations of DHA and AA in kraft pulp and paper mill effluent have been found to be as high as 10.3 and 11.4 mg/l, respectively, (Quinn et al. 2003) and DHA in water used for paper-recycling processes has been found to be 4.0–6.5 mg/l (Rigol et al. 2002). In testing the acute toxicity of effluents, rainbow trout have been most commonly used. For DHA and AA, the lethal concentrations producing a 50% mortality rate in 96 h ( $LC_{50}/96h$ ) in rainbow trout were 0.8–1.7 and 0.7–1.5 mg/l, respectively, and the  $LC_{50}/48h$  values in *Daphnia magna* were 19.2 and 2.5–6.4 mg/l, respectively (Liss et al. 1997). Moreover, DHA and AA have been reported to have allergenic effects (Eriksson et al. 2004).

On the other hand, few cytotoxicological studies have been published, however, DHA has been reported to increase cell death in human epithelial and fibroblast cells (Söderberg et al. 1996), and to exert toxic effect on human erythrocytes (Toivola & Isomaa 1991) and on polymorph nuclear leukocytes (Sunzel et al. 1991). AA has been reported to cause lysis of human alveolar epithelial cells (Ayars et al. 1989). DHA and AA have been reported to be non-genotoxic in Salmonella/mammalian-microsome assay (Nestmann et al. 1979). In the present study, DHA and AA exhibited DNA-damaging activity in the *rec*-assay. To confirm their genotoxicity, several other *in vitro* or *in vivo* tests, such as comet assay, may be needed.

DHA and AA in the present study were detected in not only recycled-paper products but also in some virgin-paper products. Typical sources of wood used in producing virgin pulp are conifer and broadleaf trees. The wood type of the virgin pulp may be related to the content of DHA and AA, because these compounds are the major components of conifer oleoresin found in pine, spruce and fir trees. As various types of post-consumer paper are being used as material for recycled paper, pulps are mixed and DHA and AA were found in all recycled products.

In the present study, paper samples were refluxed with ethanol for 2 h. The extraction procedure used was quite rigorous in order to obtain information on which genotoxic compounds could be found in the samples. To assess the safety of using virgin- and recycled-paper products in contact with food, further study seems necessary to examine migration into food simulants or actual foods.

In conclusion, we identified the genotoxicants in virgin and recycled-paper products using multiple liquid/liquid extraction, GPC, and subsequent GC/MS and LC/MS analysis. The *rec*-assay was used as an indicator of genotoxicity. As this assay procedure is very simple, rapid and inexpensive, it would be useful for identification of genotoxicants in mixed samples.

### References

- Ayars GH, Altman LC, Frazier CE, Chi EY. 1989. The toxicity of constituents of cedar and pine woods to pulmonary epithelium. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 83:610–618.
- Baba T, Kitano M, Kuroda K. 1998. Toxicity of paper products detected by *rec*-assay. *Annual Report of Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences* 60:18–23. [in Japanese]
- Berg vd KJ, Horst vd J, Boon JJ, Shibayama N, de la Rie ER. 1998. Mass spectrometry as a tool to study ageing processes of diterpenoid resins in works of art: GC- and LC-MS studies. *Proceedings of the International Mass Spectrometry Conference (Finland). Advances in Mass Spectrometry*, Vol. 14, pp 563–573.

- Binderup ML, Pedersen GA, Vinggaard AM, Rasmussen ES, Rosenquist H, Cederberg T. 2002. Toxicity testing and chemical analysis of recycled fibre-based paper for food contact. *Food Additives and Contaminants* 19(Suppl.):13–28.
- Castle L, Damant AP, Honeybone CA, Johns SM, Jickells SM, Sharman M, Gilbert J. 1997. Migration studies from paper and board food packaging materials. Part 2. Survey for residues of dialkylamino benzophenone UV-cure ink photoinitiators. *Food Additives and Contaminants* 14(1):45–52.
- Eriksson K, Wiklund L, Larsson C. 2004. Dermal exposure to terpenic resin acids in Swedish carpentry workshops and sawmills. *Annals of Occupational Hygiene* 48(3):267–275.
- Fauris C, Lundstrom H, Vilagines R. 1998. Cytotoxicological safety assessment of papers and boards used for food packaging. *Food Additives and Contaminants* 15(6):716–728.
- Kada T, Hirano K, Sirasu Y. 1980. Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. *Chemical Mutagens* 6:149–173.
- Liss SN, Bicho PA, Saddler JN. 1997. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: A minireview. *Canadian Journal of Microbiology* 75:599–611.
- Martin VJJ, Mohn WW. 2000. Genetic investigation of the catabolic pathway for degradation of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *Journal of Bacteriology* 182(13):3784–3793.
- McMartin DW, Peru KM, Headley JV, Winkler M, Gillies JA. 2002. Evaluation of liquid chromatography-negative ion electrospray mass spectrometry for the determination of selected resin acids in river water. *Journal of Chromatography A* 952:289–293.
- Nestmann ER, Lee EG, Mueller JC, Douglas GR. 1979. Mutagenicity of resin acids identified in pulp and paper mill effluents using the Salmonella/mammalian-microsome assay. *Environmental mutagenesis* 1(4):361–369.
- Ozaki A, Yamaguchi Y, Fujita T, Kuroda K, Endo G. 2004. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food and Chemical Toxicology* 42:1323–1337.
- Quinn BP, Booth MM, Delfino JJ, Holm SE, Gross TS. 2003. Selected resin acids in effluent and receiving water derived from a bleached and unbleached kraft pulp and paper mill. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(1):214–218.
- Rigol A, Latorre A, Lacorte S, Barcelo D. 2002. Determination of toxic compounds in paper-recycling process waters by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 963:265–275.
- Söderberg TA, Johansson A, Gref R. 1996. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* 107:99–109.
- Sipiläinen-Malm T, Kala-Latva K, Tikkanen L, Suihko MJ, Skyttä E. 1997. Purity of recycled fibre-based materials. *Food Additives and Contaminants* 14(6–7):695–703.
- Sturaro A, Parvoli G, Rella R, Bardati S, Doretti L. 1994. Food contamination by diisopropylnaphthalenes from cardboard packages. *International Journal of Food Science and Technology* 29:593–603.
- Sunzel B, Söderberg TA, Reuterving CO, Hallmans G, Holm SE, Hänsröm L. 1991. Neutralizing effect of zinc oxide on dehydroabietic acid-induced toxicity on human polymorphonuclear leukocytes. *Biological Trace Element Research* 31:33–42.
- Toivola DM, Isomaa B. 1991. Effects of dehydroabietic acid on the erythrocyte membrane. *Chemico-biological Interactions* 79:65–78.
- Vinggaard AM, Korner W, Lund KH, Bolz U, Petersen JH. 2000. Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by in vitro yeast estrogen screen and chemical analysis. *Chemical Research and Toxicology* 13:1214–1222.
- Volkman JK, Holdsworth DG, Richardson DE. 1993. Determination of resin acids by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in paper mill effluent, river waters and sediments from the upper Derwent Estuary, Tasmania. *Journal of Chromatography* 643:209–219.
- Wang Z, Chen T, Gao Y, Breuil C, Hiratsuka Y. 1995. Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1):222–225.
- Zanella E. 1983. Effect of pH on acute toxicity of dehydroabietic acid and chlorinated dehydroabietic acid to fish and *Daphnia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 30:133–140.

## 食品用プラスチック製品に含有される酸化防止剤の抽出溶媒及び安定性の検討

羽石 奈穂子<sup>\*</sup>, 安野 哲子<sup>\*</sup>, 金子 令子<sup>\*</sup>,  
船山 恵市<sup>\*</sup>, 荻野 周三<sup>\*</sup>

### Study on Extract Solvents and Stability of Antioxidants in Food Contact Plastics

Nahoko HANEISHI<sup>\*</sup>, Tetsuko YASUNO<sup>\*</sup>, Reiko KANEKO<sup>\*</sup>,  
Keiichi FUNAYAMA<sup>\*</sup> and Shuzo OGINO<sup>\*</sup>

**Keywords** : 酸化防止剤 antioxidant, 食品用プラスチック製品 food contact plastics, 抽出溶媒 extract solvent, 安定性 stability

#### 緒言

著者らは前報<sup>1)</sup>で食品用プラスチック製品に含有される酸化防止剤の分析法を検討し、トコフェロールを加えることにより酸化防止剤の分解が抑制されることを見出した。しかし、その分析法で抽出溶媒として用いたクロロホルムは環境への負荷が懸念されることから、代替抽出溶媒について検討した。また、酸化防止剤は容易に分解されることから、溶液として保存する場合の安定性についても併せて検討を行った結果を報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試薬

標準品：食品用プラスチックに使用される酸化防止剤 8種類 (表 1)、前報<sup>1)</sup>と同等品。分解抑制剤：(±)- $\alpha$ -トコフェロール、和光純薬工業(株)製。フィルター：Millex-LH PTFE 0.45  $\mu$ m, 日本ミリポア(株)製。アセトニトリル, アセトン, クロロホルム, 酢酸エチル, シクロヘキサン, 2-プロパノール及びメタノール：JIS 特級品を用いた。

##### 2. 試料

表 1 に記載した酸化防止剤のいずれかを含有する市販食品用プラスチック製品 8 種類。

##### 3. 装置

凍結粉碎機：日本分析工業(株)製 JFC-300 型。ガスクロマトグラフ(GC)：ヒューレットパッカード社製 HP6890。高速液体クロマトグラフ(HPLC)：UV 検出器 SPD-10AV, ポンプ LC-10AT, 恒温槽 CTO-10A, デガッサー DGU-12A, 以上(株)島津製作所製。オートサンプラー システムインスツルメンツ(株)製 Model33, データ処理装置 ジーエルサイエンス(株)製 V station。

表1. 酸化防止剤の種類

慣用名	化学名
フェノール系	
BHA	4-hydroxy-3- <i>tert</i> -butylanisole
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
Antage-W 300	4,4'-butylidenebis-6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol
Irganox 1076	<i>n</i> -octadecyl-3-(4'-hydroxy-3',5'-di- <i>tert</i> -butylphenyl)propionate
Topanol CA	1,1,3-tris-(2-methyl-4-hydroxy-5- <i>tert</i> -butylphenyl)butane
リン系	
Irgafos 168	tris(2,4-di- <i>tert</i> -butylphenyl)phosphite
アデカスタブ PEP-24G	cyclic neopentane tetrayl bis(2,4-di- <i>tert</i> -butylphenyl phosphite)
イオウ系	
DMTDP	dimyristyl 3,3'-thiodipropionate

##### 4. GC 分析条件

カラム：HP-1(0.53 mm i.d.×15 m,膜厚 0.15  $\mu$ m), カラム温度：80°C(1 min)→10°C/min→320°C(5 min), 注入口温度：250°C, 検出器温度：300°C, 注入法：スプリット(スプリット比 10:1), 注入量：1  $\mu$ L, キャリアガス：He 3.5 mL/min.

##### 5. HPLC 分析条件

カラム：GLサイエンス(株)製 Inertsil Ph-3, (4.6 mm i.d.×250 mm, 5  $\mu$ m), 移動相：A 液 水, B 液 アセトニトリル, グラジエント条件：0分(A 40%, B 60%)→30分(A 0%, B 100%)→40分(A 0%, B 100%)→45分(A 40%, B 60%), 流速：1.5 mL/min, カラム温度：50°C, 検出波長：210 nm, 注入量：20  $\mu$ L

\* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

## 6. 試料溶液の調製

### 1) 抽出溶媒検討用試料溶液

100 mLの三角フラスコに凍結粉碎機により粉末化した試料 2 g を入れトコフェロールのアセトン溶液(50 mg/mL)1 mLを加え、更にクロロホルム、アセトン、酢酸エチル、メタノール、アセトニトリルまたはシクロヘキサン・2-プロパノールの1:1混液(以下CP混液と略す)を各々30 mL加え一昼夜放置した。15分間超音波抽出後再度一昼夜放置した。ろ過後残さを各溶媒30 mLで各々洗浄し、ろ液とあわせ減圧濃縮し2 mLとした。必要によりフィルターを通し抽出溶媒検討用試料溶液とした。

### 2) 安定性検討用試料溶液

酸化防止剤標準品を各々10 mg秤取し、CP混液で10 mLとしたものを標準原液とした。アデカスタブ PEP-24Gを除く標準原液を各々1 mLとり、CP混液で10 mLとしたものを単品試料溶液とした(100  $\mu$ g/mL)。

Irgafos 168の標準原液1 mLに、トコフェロールのアセトン溶液(50 mg/mL)20  $\mu$ Lあるいは7種の酸化防止剤の標準原液1 mLを加え、CP混液で10 mLとしたものを2種混合試料溶液とした。

標準原液8種類を各々1 mLとり混合し、CP混液で10 mLとしたものを8種混合試料溶液とした。

## 7. 安定性試験

上記6.の2)で調製した単品試料溶液及び8種混合試料溶液中の各酸化防止剤、2種混合試料溶液中の Irgafos 168を、調製日より1、3及び7日後にGCにより測定し残存率を求めた。ただし、Irgafos 168共存下での Irganox 1076のみ HPLCにより測定した。

### 結果及び考察

#### 1. 抽出溶媒の検討

クロロホルムの代替抽出溶媒として、酢酸エチル、アセトン、メタノール、アセトニトリル及びCP混液の5種類の溶媒について検討した。プラスチック製品中の各酸化防止剤をクロロホルムで抽出後減圧濃縮し、得られた定量値を100%としたときの各溶媒における回収率を表2に示し

た。その結果、酢酸エチルでは BHA, BHT, Ant-W 300 及び Topanol CA で 95 %以上の回収率を示した。アセトン及びメタノールでは 80 %以上の回収率を示した酸化防止剤は BHT のみであった。アセトニトリルでは 8 種類の酸化防止剤の回収率はすべて 50 %以下であった。抽出溶媒として河村らが使用している CP 混液では<sup>2)</sup>、アデカスタブ PEP-24G の回収率は 41 %と低かったが残り 7 種類の酸化防止剤では 86~102 %と良好であった。以上のことから、8 種類中 7 種類の酸化防止剤の回収率が良好な CP 混液は、クロロホルムに代替する抽出溶媒として使用できると考えられた。

CP 混液を用いた場合にアデカスタブ PEP-24G の回収率が低下した原因として、アデカスタブ PEP-24G は CP 混液における抽出効率が低いこと、減圧濃縮操作時に分解することが推察された。

そこで、CP 混液とクロロホルムの抽出効率を比較するため、超音波抽出後減圧濃縮操作を加えずに調製した両抽出溶液中のアデカスタブ PEP-24G を測定したところ、CP 混液の抽出量はクロロホルムの約 1/2 であった。このことから CP 混液の抽出効率はクロロホルムより低いことが判明した。

また、前報<sup>1)</sup>で報告したようにクロロホルム抽出溶液における減圧濃縮操作ではトコフェロールが分解抑制効果を示したが、極性溶媒(2-プロパノール)を含有する CP 混液の標準溶液で同様の実験を行ったところ、分解抑制効果は認められなかった。酸化防止剤の中でも特にリン系酸化防止剤は加水分解する性質がある<sup>3)</sup>。今回測定対象としたリン系酸化防止剤の中でアデカスタブ PEP-24G は加水分解し、変質しやすいといわれている<sup>4)</sup>。そのため、極性溶媒の存在下では減圧濃縮操作により加水分解すると推定された。

#### 2. 安定性の検討

酸化防止剤は安定性が低く、溶液中で自ら酸化し酸化物を生成する可能性がある。そこで CP 混液で調製した酸化防止剤標準溶液の安定性を検討した。また、プラスチック製品中の酸化防止剤を測定するために調製する試料溶液中には、分解抑制剤としてトコフェロールを加えてあるため<sup>1)</sup>、

表 2. 酸化防止剤の抽出溶媒別回収率

	回収率 (%) <sup>a)</sup>							
	BHA	BHT	Antage-W 300	Topanol CA	Irganox 1076	Irgafos 168	アデカスタブ PEP-24G	DMTDP
クロロホルム	100	100	100	100	100	100	100	100
酢酸エチル	96	97	95	98	34	56	48	70
アセトン	71	81	65	60	30	27	9	43
メタノール	9	89	33	11	66	5	0.8	12
アセトニトリル	15	50	40	22	38	4	0.6	12
CP混液 <sup>b)</sup>	99	101	90	89	102	86	41	89

a) : クロロホルムを使用したときの測定値を100%とする(n=3)

b) : シクロヘキサン・2-プロパノール(1:1)

各酸化防止剤の安定性に対するトコフェロールの影響も検討した。GC 測定にあたり, Irgafos 168 の酸化物と Irganox 1076 のリテンションタイムが重なるため, これら 2 つの酸化防止剤を含有する溶液中の Irganox 1076 は HPLC により定量を行った。

1) CP 混液における各酸化防止剤の安定性

アデカスタブ PEP-24G を除く 7 種類の酸化防止剤に対しクロロホルムの代替として最も適当と思われた CP 混液を用い, 単品試料溶液により各酸化防止剤の残存率を比較した結果を図 1 に示した。Irgafos 168 を除く 6 種類の酸化防止剤は CP 混液中では安定しており, 7 日後でも残存率 95 % 以上を示した。一方 Irgafos 168 は分解し, 7 日後の残存率は 70 % 以下であった。そこで Irgafos 168 の溶液に他の酸化防止剤を加えることにより Irgafos 168 の分解を抑制することを検討した。

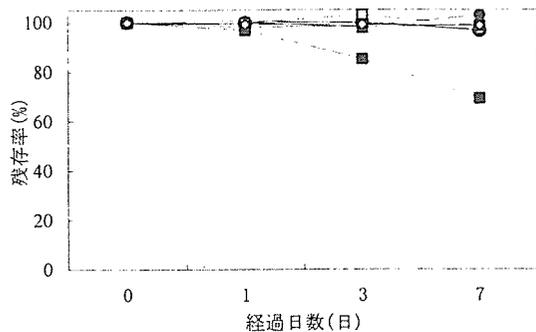


図1. 各酸化防止剤の安定性

- BHA
- △ Antage W-300
- Irganox 1076
- ◇ DMTDP
- BHT
- ▲ Topanol CA
- Irgafos 168

2) Irgafos 168 の安定性を高める酸化防止剤

Irgafos 168 に対し酸化防止剤を等量加えて 2 種混合試料溶液を調製し, Irgafos 168 の残存率を比較した(図 2)。アデカスタブ PEP-24G を加えると Irgafos 168 の安定性は高まり, 3 日後は約 100 %, 7 日後でも 95 % 以上の残存率を示した。トコフェロールもアデカスタブ PEP-24G に次

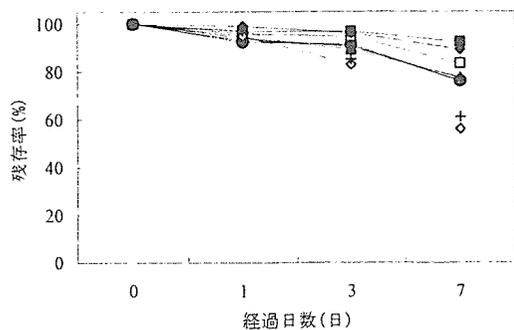


図2. Irgafos 168 の安定性に対する各酸化防止剤の添加効果

- BHA
- △ Antage W-300
- Irganox 1076
- ◇ DMTDP
- BHT
- ▲ Topanol CA
- アデカスタブ PEP-24G
- ◆ トコフェロール
- + Irgafos 168 単独

いで Irgafos 168 の安定性に寄与し, 7 日後の残存率は 90 % 以上であった。前報<sup>1)</sup>に従いプラスチック製品中の酸化防止剤を分析する場合は, 試験溶液にトコフェロールを加えているため, 試験溶液の経時的な分解に対しトコフェロールが有効であると推察された。

3) 混合溶液中の酸化防止剤の安定性

混合標準溶液中の酸化防止剤の安定性を検討するため, 8 種類の混合溶液(8 種混合試料溶液)中における各剤の残存率を比較し図 3 に示した。アデカスタブ PEP-24G は回収率が低いため CP 混液溶液では測定対象としなかったが, 他の酸化防止剤に対する分解抑制効果を検討するため混合溶液に加えた。BHA, BHT, Antage W-300, Topanol CA, Irganox 1076 及び DMTDP では単品試料溶液と同様に 7 日後の残存率は 95 % 以上を示し, 混合溶液中でも安定であった。Irgafos 168 の単品試料溶液での残存率は, 7 日後は 70 % 以下であったが, 8 種混合溶液中では 95 % 以上を示した。このことから, 混合溶液中では各酸化防止剤が相互に分解抑制効果を示したと推察された。

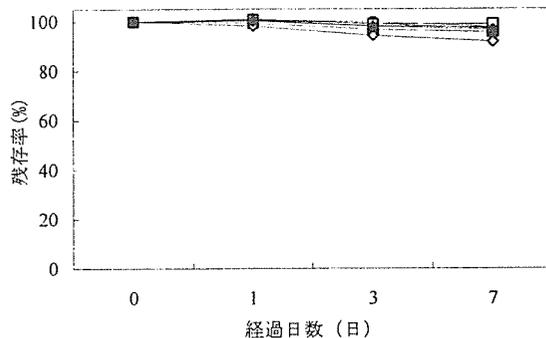


図3. 混合溶液中での各酸化防止剤の安定性

- BHA
- △ Antage W-300
- Irganox 1076
- ◇ アデカスタブ PEP-24G
- BHT
- ▲ Topanol CA
- Irgafos 168
- ◆ DMTDP

ま と め

食品用プラスチック製品に含有される酸化防止剤の抽出溶媒として, 環境に負荷を与えるクロロホルムの代替となる抽出溶媒を検討した。その結果, シクロヘキサン・2-プロパノール(1:1)は, アデカスタブ PEP-24G の回収率は 41 % と低かったが他の 7 種類の酸化防止剤では 95 % 以上であったことから, 抽出溶媒として代替可能であると考えられた。

溶液中の酸化防止剤の安定性について検討したところ, Iragos 168 を除き各酸化防止剤単品を溶解した場合の 7 日後の残存率は 95 % 以上であった。Irgafos 168 の残存率は 70 % 以下であったが, 分解抑制のためアデカスタブ PEP-24G またはトコフェロールを加えると残存率は 90 % 以上を示した。また, 8 種類の酸化防止剤混合溶液中における各酸化防止剤の 7 日後の残存率は 90 % 以上であり相互に分解抑制効果を示したと考えられた。

## 文 献

- 1) 羽石奈穂子, 金子令子, 船山恵市, 他: 東京健安研七  
年報, **54**, 121-125, 2003.
- 2) 河村葉子, 渡辺一成, 佐山佳代, 他: 食衛誌, **38**,  
307-318, 1997.
- 3) 皆川源信: プラスチック添加剤活用ノート 67, 1996,  
工業調査会, 東京.
- 4) 春名徹: リン・イオウ系酸化防止剤の現状と動向, シ  
ーエムシー編, 高分子添加剤の開発と最新技術, 64-65,  
1992, シーエムシー, 東京.

## 乳幼児用玩具中の有害 8 元素およびその溶出試験

(平成 17 年 9 月 16 日受理)

河村 葉子\*† 川崎 智恵\* 峰 幸加\*  
六鹿 元雄\* 棚 元憲一\*

## Contents of Eight Harmful Elements in Baby Toys and Their Migration Tests

Yoko KAWAMURA†, Chie KAWASAKI, Sachika MINE,  
Motoh MUTSUGA and Kenichi TANAMOTO(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan; †Corresponding author)

Levels of eight harmful elements, *i.e.*, antimony, arsenic, barium, cadmium, chromium, lead, mercury and selenium, were investigated in 45 baby toys and 10 paints, which were mainly made of polyvinyl chloride. All samples contained barium at levels of 0.3–3,700 mg/kg, several samples contained cadmium (0.2–26 mg/kg), chromium (0.5–280 mg/kg) and lead (1.5–1,300 mg/kg), and one sample contained antimony (5.3 mg/kg). They might have been used as colorants of the toy materials and paints. They were then evaluated using the migration test of ISO 8124-3, in which samples were ground up, and then soaked in 0.07 mol/L HCl at 37°C for two hours. Barium, cadmium, chromium and lead migrated from some of the samples, but at levels lower than the migration limits required by ISO 8124-3. Compared with the Japanese official method, the ISO method resulted in higher migration, but there are significant differences in the migration limits, test method, and so on between them. Further investigation is needed in this area.

(Received September 16, 2005)

**Key words:** 乳幼児用玩具 baby toy; 材質試験 material test; 溶出試験 migration test; バリウム barium; カドミウム cadmium; クロム chromium; 鉛 lead; アンチモン antimony

## 緒 言

乳幼児用玩具はカラフルに塗装または着色されたものが多く、それらの着色料としてしばしば金属顔料が使用される。また、玩具の素材として汎用されるポリ塩化ビニルの安定剤として鉛やカドミウム化合物が使用される可能性がある。しかし、玩具中に残存する金属の種類や含有量などに関する報告は見られない。

食品衛生法のおもちゃの規格基準では、玩具からの金属溶出を規制するため、溶出試験により、塩化ビニル樹脂塗料およびポリ塩化ビニルについては重金属試験は鉛として 1 ppm 以下、カドミウムは 0.5 ppm 以下、ポリエチレンなどには重金属試験は鉛として 1 ppm 以下と規定している。

一方、国際標準化機構 (ISO) では、1997 年に ISO 8124-3 “Safety of toys Part 3: Migration of certain elements” を制定し、アンチモン (Sb)、ヒ素 (As)、バリウム (Ba)、カドミウム (Cd)、クロム (Cr)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg) お

よびセレン (Se) の 8 元素について、試験法と溶出基準値を定めている (Table 1)<sup>1)</sup>。

そこで、我が国の乳幼児用玩具について、これら 8 元素の含有量の調査を行うとともに、ISO 規格に準じた溶出試験の適用を試みたので報告する。

## 実験方法

## 1. 試 料

塗料: 市販家庭用塗料 4 品目 (ビニル樹脂塗料透明および黄色、カシュー塗料赤色、アクリル樹脂塗料緑色)。これらに同容量のシクロヘキサノンを加えて混和し、ガラス板に表面積 100 cm<sup>2</sup> につき 0.8 g の割合になるように均等に塗布し、24 時間以上自然乾燥させたものを試料とした。

玩具: 2001 および 2002 年に東京都内の玩具店、スーパーマーケット、デパートおよび百円ショップで購入した塗装または着色された玩具 41 品目、内訳は人形 8 品目、動物玩具 8 品目、ままごと用擬似食品 3 品目、ボール 12 品目、空気注入玩具 8 品目、クレヨン 1 品目および粘土 1 品目。そのうち、広範囲に塗装されていた人形 4 品目お

† 連絡先

\* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1. Maximum Acceptable Element Migration from Toy Materials Required by ISO 8124-3

Toy materials	Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
Any toy materials except the next	60	25	1,000	75	60	90	60	500
Modeling clay and finger paint	60	25	250	50	25	90	25	500

Unit: mg/kg in material

よび動物玩具 6 品目は、塗装部分と本体部分を分けて検体とした。また、クレヨンおよび粘土は、赤、青、黄の各色を別の検体とした。そのため、合計 55 検体となった。

## 2. 試 薬

塩酸：精密分析用（含量 36%）、硝酸：有害金属測定用（含量 61%）、過酸化水素水：特級（含量 30%）以上シグマアルドリッチジャパン(株)製

アンチモン、ヒ素、バリウム、カドミウム、クロム、鉛、水銀およびセレン標準溶液：各元素の標準液（1,000 ppm、和光純薬工業(株)製）を適宜混合し、0.07 mol/L 塩酸を用いて希釈した。

## 3. 装 置

ICP 発光分光分析装置：SPS7800 セイコーインスツルメンツ(株)製

超音波ネブライザー：U-5000AT<sup>+</sup> CETAC 社製

マイクロウェーブ試料前処理装置：ETHOS900 マイクロストーンゼネラル(株)製

## 4. ICP 測定条件

高周波出力：1.2 kW

キャリアーガス：Ar 0.35 L/min, プラズマガス：Ar 16 L/min, 補助ガス：Ar 0.6 L/min

分析線波長：アンチモン 206.833 nm, ヒ素 193.696 nm, バリウム 455.403 nm, カドミウム 214.438 nm, クロム 283.563 nm, 鉛 220.353 nm, 水銀 253.652 nm, セレン 196.026 nm

## 5. 材質判別

玩具の塗装および本体がポリ塩化ビニルであるか否かを判別するために炎色反応を行った。直径約 1 mm の銅線の先端をバーナーの酸化炎で緑色の炎が生じなくなるまで熱し、熱いうちに試料に接触させて少量を銅線に付着させ、再び酸化炎に入れた。緑色の炎が生じたときは塩素を含有する塩化ビニル樹脂塗料またはポリ塩化ビニルと判定した。なお、これらの用途には他の塩素系樹脂は使用されない。

## 6. 試料の調製

玩具の塗装はカッターまたはハサミでできるだけ細かく削り取り、玩具本体はハサミなどで 2~3 mm 角に細切したものを試料とした。ただし、食品衛生法による溶出試験（公定法）では、玩具をそのまま、または試験片を作成して試料とした。

## 7. 材質試験

### 1) マイクロウェーブ法

塗装は 0.3 g, 本体は 0.5 g を精ひょうしてテフロン容器に入れ、硝酸 3 mL および過酸化水素 0.6 mL を加え、マ

イクロウェーブ試料前処理装置により加熱し灰化した。

加熱プログラム：250 W, 1 min→0 W, 1 min→250 W, 5 min→400 W, 5 min→650 W, 5 min→400 W, 30 min 冷後、0.07 mol/L 塩酸を加えて 15 mL に定容したのち、ろ過して試験溶液とした。

### 2) 電気炉法

塗装は 0.3 g, 本体は 0.5 g を精ひょうして石英製蒸発皿に入れ、硫酸 1.2 mL を加え、ホットプレート上で硫酸が蒸発し大部分が炭化するまで加熱した。これを 450℃ の電気炉に入れて完全に灰化した。これに塩酸 (1→2) 3 mL を加えてかき混ぜ、ホットプレート上で蒸発乾固した。冷後、0.07 mol/L 塩酸を加えて 15 mL に定容し、ろ過して試験溶液とした。

## 7. 溶出試験

### 1) ISO 法

ISO 8124-3 の溶出試験法に準じた。試料 0.4 g を精ひょうし、0.07 mol/L 塩酸 10 mL（試料の 25 倍量）を 37℃ に加温して加えた。遮光しながら 37℃ で 1 時間連続して振とう後、37℃ で 1 時間放置し、ろ過して試験溶液とした。

### 2) 公定法

食品衛生法の「食品、添加物等の規格基準第 4 おもちゃ」\*1 の溶出試験法に従った。試料は、その表面積 1 cm<sup>2</sup> につき 2 mL の水を 40℃ に加温したものに浸漬し、40℃ に保ちながら時々かき混ぜて 30 分間放置し、ろ過して試験溶液とした。塗装された試料は塗装と本体を分離せず、製品のまままたは試験片として試験を行った。

## 8. 添加回収試験（材質試験）

塗装 0.3 g, または本体 0.5 g に 100 ppm 標準溶液 75 μL (7.5 μg) を添加し、材質試験のマイクロウェーブ法に従って試験溶液を調製し、ICP で定量した。ただし、ヒ素およびバリウムはそれぞれ単独で、その他の 6 元素は混合して試験を行った。

## 実験結果および考察

### 1. 測定法の検討

1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 および 1,000 μg/L の標準溶液を用いて、ICP または超音波ネブライザーを装着した ICP により測定を行い、8 元素の検量線を作成し定量限界を求めた。いずれの方法および元素においても、検量線は定量限界から 1,000 μg/L まで極めて高い直線性が得られた。また、定量限界としては、検量線の直線範囲内

\*1 <http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/html/hourei/contents.html>

Table 2. Determination Limits of Elements in Standard Solution Analyzed by ICP

Equipment	Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
ICP	100	100	5.0	5.0	20	50	100	200
ICP with ultrasonic nebulizer	50	50	1.0	1.0	5.0	10	500	50

Unit:  $\mu\text{g/L}$ .

Element standards were dissolved in 0.07 mol/L hydrochloric acid solution.

Table 3. Comparison of Determined Element Levels in Paints Ashed by Microwave Method and Furnace Method

Sample	Microwave method								Furnace method							
	Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se	Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
Paint 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Paint 2	ND	ND	6,100	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	1,100	ND	1.0	ND	ND	ND
Paint 3	ND	ND	1,300	ND	ND	5.6	ND	ND	ND	ND	310	ND	ND	3.6	ND	ND
Paint 4	ND	ND	4,800	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	150	ND	ND	ND	ND	ND
Spiked paint 1	22	18	24	22	24	22	21	23	19	20	17	25	26	25	ND	ND
Spiked paint 3	21	18	—	19	20	25	20	22	16	20	—	25	21	24	ND	ND
Determination limit	5.0	5.0	0.3	0.3	1.0	2.5	5.0	10	5.0	5.0	0.3	0.3	1.0	2.5	5.0	10

Unit: mg/kg in dried paint.

Values are the mean of two trials.

Paint 1: vinyl resin (clear), Paint 2: vinyl resin (yellow), Paint 3: cashew nut resin (red), Paint 4: acrylic resin (green)

Spiked samples were added at the rate of  $7.5\mu\text{g}$  of element in 0.3 g of paint film (25 mg/kg).

—: not examined

にあり、しかも S/N 比 10 倍以上の複数のポイントがピークを形成し、元素の確認が可能な濃度とした。

Table 2 に示すように、ICP における 8 元素の定量限界は 5~200  $\mu\text{g/L}$  であった。一方、超音波ネブライザーを装着すると、水銀以外の 7 元素は 2~10 倍高感度となった。しかし、水銀は ICP のみでも 100  $\mu\text{g/L}$  と感度があまりよくなかったが、超音波ネブライザーでは 500  $\mu\text{g/L}$  とさらに感度が低下した。

ISO の溶出試験では規格値の 1/10 まで測定することを要求している。一方、ISO の試験溶液の調製法において試料は 50 倍希釈されることから、ICP のみではヒ素が規格値の 1/5、超音波ネブライザーを用いると水銀が一般規格の 2/5 までしか測定できなかった。しかし、それ以外は規格値の 1/10 まで測定可能であった。そこで、超音波ネブライザーを用いずに ICP のみで測定し、溶出試験における 0.07 mol/L 塩酸の添加量を ISO 原法の 1/2 である試料の 25 倍量とすることにより、全元素で規格値の 1/10 以下まで測定可能とした。

## 2. 試験溶液の安定性

ISO 8124-3 では、試験溶液を調製後 1 日以内に測定しない場合には、試験溶液の濃度が 1 mol/L となるように塩酸を加えるように定めている。そこで、0.07 mol/L および 1 mol/L の塩酸溶液中の 8 元素の安定性について検討した。各元素を 200  $\mu\text{g/L}$  になるように 0.07 mol/L および 1 mol/L の塩酸で調製してプラスチック試験管に、一部はガラス試験管にも入れた。同条件の検体を 8 本ずつ用意し、4°C で保存しながら 0, 1, 3 および 7 日目に 2 本ずつ測定した。

その結果、酸濃度や試験管の材質にかかわらず、アンチ

モン、バリウム、カドミウム、クロムおよび水銀の 5 元素では 7 日間濃度の変化はほとんど見られず安定であった。一方、7 日目のみにヒ素および鉛で約 15%、セレンでは約 30% の減少が観察された。原因として容器壁への吸着などが疑われた。

以上のことから、酸濃度の調整は必ずしも有効ではなく、試験溶液はできるだけ速やかに、少なくとも 3 日以内に測定することが望ましいと考えられた。

## 3. 材質試験の検討

### 1) 灰化法

市販家庭用塗料から作製した塗膜およびそれに 8 元素を添加したものをを用いて、マイクロウェーブと電気炉による灰化法を比較した。マイクロウェーブの灰化条件は装置のアプリケーションに準じ、電気炉による灰化法は食品衛生法の「食品、添加物等の規格基準」の合成樹脂製器具・容器包装一般規格のカドミウムおよび鉛試験法改正案\*2 に準じた。

Table 3 に示すように、塗料 2~4 には大量のバリウムが存在していたが、マイクロウェーブ法のほうがはるかに高い測定値を示した。塗料からはそのほかにクロムと鉛が各 1 検体で検出されたが、いずれもマイクロウェーブ法のほうが高かった。また塗料に元素を添加した場合には、電気炉法では水銀およびセレンが検出されず、バリウムもやや低かった。

これらの元素のうち、水銀およびセレンは揮散しやすいことから、電気炉において乾燥状態で 450°C に加熱されたとき揮散したものと考えられた。またバリウムは、電気

\*2 <http://www.whoirei.mhlw.go.jp/shingi/2005/03/50316-7.html>

炉法では硫酸を添加するため、可溶性バリウムの一部が不溶性の硫酸バリウムに変化し、測定値が大きく低下したものと推定された。以上のことから、試料の灰化は8元素がほぼ良好に測定できるマイクロウェーブ法により行うこととした。

なお、塗料2~4では、いずれの灰化法でも灰化後の溶液に大量の白色沈殿物が見られ、蛍光X線により硫酸バリウムであることが確認された。その重量は試料の10~20%に相当し、ICPによって測定されたバリウム量の数十倍に達した。硫酸バリウムは酸に不溶性のため、灰化後も沈殿物として析出し、酸可溶性バリウムのみがICPで測定されたと考えられる。なお、純度の高い硫酸バリウムを同様に処理してもバリウム測定値の増加は見られず、灰化操作により硫酸バリウムから可溶性バリウムには変化しないことが確認された。硫酸バリウムは滑らかで延びがよいことから、白色顔料または顔料の基材として塗料に使用される。

#### 2) 添加回収試験

家庭用塗料4検体と玩具3検体(人形2, 動物玩具2およびボール3)に8元素の標準溶液を添加し、回収試験を行った。ただし、塗料2~4は大量のバリウムが存在するため、バリウムの添加試験は行わなかった。

その結果、Table 4 に示すように回収率は62~100%

であり、8元素はいずれの試料でもほぼ良好な回収が得られた。ただし、塗料2~4は、他に比べて回収率がやや低かった。これらの試料では前述のように大量の白色沈殿物が見られ、ろ過により除去したことから、それらに吸着して回収率が低下したことが考えられた。

#### 4. 玩具中の8元素含有量

##### 1) 玩具塗装

塗料には金属顔料が使用されることが多いことから、玩具の中でも塗装部分に金属含有量の高いことが予想された。そこで、入手した玩具のうち広範囲に塗装されていた10検体について、塗装部分のみを削り取って試料とした。これらの8元素含有量および沈殿物量を Table 5 に示した。

バリウムは10検体すべてから検出されたが、1.9~2,600 mg/kg と試料により大きな差が見られた。最高値を示した塗装10のみが2,600 mg/kg と家庭用塗料と同程度であったが、それ以外は家庭用塗料より大幅に低かった。さらに、カドミウムが3検体から1.0~1.9 mg/kg, クロムが4検体から1.3~38 mg/kg, 鉛が4検体から3.2~220 mg/kg 検出された。一方、アンチモン、ヒ素、水銀およびセレンの4元素はいずれの塗装からも検出されなかった。また、白色沈殿物はすべての試料で認められたが、5検体で2.0~16%, 半数は1%未満であり、家庭

Table 4. Recoveries of Eight Elements from Spiked Paint Film and Toy Material

Sample	Material	Recovery (%)							
		Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
Paint 1	Vinyl resin	89	70	97	88	94	89	84	93
Paint 2	Vinyl resin	83	62	—	79	84	73	76	77
Paint 3	Cashew nut resin	82	73	—	76	80	78	79	88
Paint 4	Acrylic resin	86	89	—	78	86	78	77	77
Toy material 1	Polyvinyl chloride	82	93	91	89	88	90	79	86
Toy material 2	Polyvinyl chloride	93	87	98	90	97	91	81	100
Toy material 3	Polyvinyl chloride	80	76	93	82	90	82	82	97

Samples (paint film 0.3 g, toy material 0.5 g) were spiked at the rate of 7.5  $\mu$ g of element.

Values are the mean of two trials.

—: not examined

Table 5. Contents of Eight Elements and White Precipitate in Paint Films of Toys

Sample	Color	Content (mg/kg)								Precipitate (%)
		Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se	
1	Light green + white	ND	ND	6.6	1.9	ND	4.1	ND	ND	15
2	Pink + white	ND	ND	1.9	1.0	1.3	3.2	ND	ND	16
3	Green	ND	ND	3.5	ND	1.7	6.2	ND	ND	Tr
4	Red	ND	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
5	Green + yellow	ND	ND	14	ND	38	220	ND	ND	2.0
6	Black	ND	ND	15	1.5	ND	ND	ND	ND	Tr
7	Yellow	ND	ND	51	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
8	Red	ND	ND	270	ND	ND	ND	ND	ND	5.0
9	Red purple	ND	ND	440	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
10	Blue	ND	ND	2,600	ND	1.4	ND	ND	ND	6.3
Determination limit		5.0	5.0	0.3	0.3	1.0	2.5	5.0	10	1.0

Values are the mean of two trials.

用塗料よりも少なかった。

鉛とクロムは同時に検出されることが多く、黄色のクロム酸鉛の使用が推測された。特に塗装5は緑色と黄色が混ざり合った色調であったが、クロム 38 mg/kg および鉛 220 mg/kg といずれも高濃度であった。

玩具塗装中のバリウム含有量と白色沈殿物量、すなわち硫酸バリウム量とは全く相関が見られなかった。塗装1

および2は沈殿物量が15および16%と高かったが、バリウムは6.6および2.6 mg/kgと低く、塗装10ではバリウム含有量は高かったが白色沈殿物は少量であった。測定されたバリウムは、硫酸バリウムの不純物として混入した可溶性バリウム、または顔料として使用されたクロム酸バリウムなどの可溶性バリウムと推定された。

Table 6. Contents of Eight Elements in Toy Materials

Sample No.	Color	Content (mg/kg)								Precipitate (%)
		Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se	
Doll	1 Clear	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	2 Red	ND	ND	1.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 Light brown	ND	ND	1.2	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	4 Ocher	ND	ND	2.6	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	5 Yellow	ND	ND	3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6 Flesh color	ND	ND	3.3	ND	6.6	ND	ND	ND	Tr
	7 Brown	ND	ND	16	ND	1.2	ND	ND	ND	Tr
	8 Red	ND	ND	160	ND	1.0	ND	ND	ND	Tr
Animal toy	1 Red	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	2 Flesh color	ND	ND	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	1.0
	3 Yellow	ND	ND	0.9	ND	0.6	ND	ND	ND	Tr
	4 Orange	5.3	ND	11	ND	38	200	ND	ND	ND
	5 Yellow	ND	ND	180	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	6 White	ND	ND	210	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	7 Green	ND	ND	240	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	8 Yellow	ND	ND	1,200	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
Pseudo-food	1 Orange	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	2 Red	ND	ND	0.5	ND	0.5	ND	ND	ND	ND
	3 Red	ND	ND	1,200	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ball	1 Orange	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	2 Fluor-yellow	ND	ND	0.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 Green	ND	ND	0.9	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	4 Green	ND	ND	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5 Pink	ND	ND	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	6 Orange	ND	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7 Blue	ND	ND	5.9	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	8 Gray	ND	ND	18	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	9 Yellow	ND	ND	54	ND	76	350	ND	ND	Tr
	10 Brown	ND	ND	140	0.4	280	1,300	ND	ND	3.0
	11 Clear-blue	ND	ND	520	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	12 Pink + yellow	ND	ND	750	26	ND	ND	ND	ND	1.3
Inflated air toy	1 Red	ND	ND	510	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	2 Blue	ND	ND	580	ND	ND	1.5	ND	ND	5.0
	3 Green	ND	ND	600	1.7	ND	ND	ND	ND	Tr
	4 Yellow	ND	ND	620	ND	ND	ND	ND	ND	Tr
	5 Yellow	ND	ND	720	ND	0.5	ND	ND	ND	1.2
	6 Yellow	ND	ND	830	0.2	0.7	ND	ND	ND	Tr
	7 Green	ND	ND	1,000	ND	0.7	3.5	ND	ND	Tr
	8 Red	ND	ND	1,500	ND	ND	ND	ND	ND	2.3
Crayon	1 Blue	ND	ND	0.3	ND	0.7	ND	ND	ND	30
	2 Yellow	ND	ND	0.3	ND	0.6	ND	ND	ND	30
	3 Red	ND	ND	3,700	ND	5.0	ND	ND	ND	30
Clay	1 Red	ND	ND	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2 Blue	ND	ND	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 Yellow	ND	ND	0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Determination limit		3.0	3.0	0.2	0.2	0.5	1.5	3.0	6.0	1.0

Values are the mean of two trials. Tr of precipitate is approximately 0.5–1.0%.

## 2) 玩具本体

市場に流通する各種玩具 45 検体について 8 元素の含有量および白色沈殿物量を測定した (Table 6). 玩具のうち塗装があるものについては、主に塗装のない部位を試料とした。塗装部分と同様に、すべての検体からバリウムが 0.3~3,700 mg/kg 検出された。特に空気入れ玩具では 510~1,500 mg/kg と高めであった。白色沈殿物はクレヨン以外は少なく、ここでもバリウム含有量との相関は見られなかった。クレヨンについては同一製品の色違いであり、白色沈殿量も同じであるにもかかわらず No. 3 のみバリウム含有量が高かったことから、バリウム系顔料に由来すると考えられた。

クロムが 14 検体から 0.5~280 mg/kg, 鉛が 5 検体から 1.5~1,300 mg/kg, カドミウムが 4 検体から 0.2~26 mg/kg, アンチモンが 1 検体から 5.3 mg/kg 検出された。これらはいずれも本体の着色に用いた顔料由来と推定された。特にボール 10 はキャラクターの図柄であったが、カドミウム 1,300 mg/kg, クロム 280 mg/kg と極めて高い含有量であった。

材質中に含有される元素の種類や量については、塗装と本体で大きな相違はなく、本体の着色にも金属顔料が汎用されていることが示された。

## 3) 玩具の材質判別と元素含有量

今回の試験に用いた玩具および塗装について材質判別を行ったところ、塗装は No. 6 以外の 9 検体が塩化ビニル樹脂塗料、玩具本体は人形 3 および 4, 擬似食品 3, クレヨン 1~3 および粘土 1~3 の 9 検体を除く 36 検体がポリ塩化ビニル製であった。しかし、材質と金属の含有量には特に関連は見られず、玩具では材質にかかわらず無機系顔料が多用されていることが推察された。

## 5. 玩具からの 8 元素溶出試験

### 1) ISO 法による溶出試験

玩具の塗装および本体のうち、含有量が高かった 16 検体について、ISO 法に準じて溶出試験を行った (Table 7). バリウムは全検体から溶出が認められ、塗料 10 では 190 mg/kg と最も高い溶出を示した。一方、カドミウムは 2 検体から 0.7 および 1.6 mg/kg, クロムは 1 検体から 1.0 mg/kg, 鉛は 2 検体から 3.9 および 5.2 mg/kg の溶出が見られた。

高い溶出量が見られた試料では材質中の残存量も高めであったが、材質中の濃度が高くて溶出量が低いものも多く、必ずしも相関は見られなかった。また、塗装のほうが玩具本体より溶出しやすく、バリウムはカドミウム、クロム、鉛よりも溶出しやすい傾向が見られた。元素の溶出量は、含有量だけでなく、金属の存在状態、玩具の材質、共存物質などにより大きく影響を受けることが推測された。

今回の溶出量を ISO 8124-3 の規格値 (Table 1) と比較すると、塗料 10 のバリウムが規格値の 1/5 程度であったが、それ以外はいずれも規格値の 1/10 よりも低く、安全性の上で特に問題はないと判断された。

### 2) 溶出試験法の比較

ISO 法は溶出試験ではあるが、試料を粉碎または細切して試験を行うこと、溶出溶媒として 0.07 mol/L 塩酸を用いること、37°C に加温して 1 時間振とう後さらに 1 時間放置することなど、従来の器具・容器包装や玩具の溶出試験とはかなり異なる。そこで、ISO 法、溶媒のみを器具・容器包装の金属の溶出試験で用いる 4% 酢酸に変更したものの、および食品衛生法の玩具の溶出試験である製品または試験片を水 40°C に 30 分間浸漬の 3 種類の溶出方法について、前項で元素が複数溶出した 4 検体を用いて比較検

Table 7. Migration Level of Eight Elements from Toy Paints and Materials

Sample	No.	Migration level (mg/kg)							
		Sb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
Paint	1	ND	ND	3.4	0.7	ND	ND	ND	ND
	3	ND	ND	2.3	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	1.3	ND	1.0	5.2	ND	ND
	10	ND	ND	190	ND	ND	ND	ND	ND
Doll	5	ND	ND	0.5	ND	ND	ND	ND	ND
	8	ND	ND	1.0	ND	ND	ND	ND	ND
Animal toy	4	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
	8	ND	ND	19	ND	ND	ND	ND	ND
Ball	9	ND	ND	0.6	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	0.8	ND	ND	3.9	ND	ND
	12	ND	ND	5.8	1.6	ND	ND	ND	ND
Inflated air toy	3	ND	ND	16	ND	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	13	ND	ND	ND	ND	ND
	8	ND	ND	1.4	ND	ND	ND	ND	ND
Crayon	3	ND	ND	23	ND	ND	ND	ND	ND
Determination limit		2.5	2.5	0.2	0.2	0.5	1.3	2.5	5.0

Table 8. Comparison of Migrated Element Levels Using Different Test Conditions

Sample	Test method				Migration level			
	Sample form	Solvent	Temp.	Time	Ba	Cd	Cr	Pb
Paint 1	Powder	0.07 mol/L HCl	37°C	2 hr	3.4	0.7	ND	ND
	Powder	4% CH <sub>3</sub> COOH	37°C	2 hr	3.2	0.6	ND	ND
	Whole	Water	40°C	30 min	ND	ND	ND	ND
Paint 5	Powder	0.07 mol/L HCl	37°C	2 hr	1.3	ND	1.0	5.2
	Powder	4% CH <sub>3</sub> COOH	37°C	2 hr	1.1	ND	0.9	5.5
	Whole	Water	40°C	30 min	ND	ND	ND	ND
Ball 10	Powder	0.07 mol/L HCl	37°C	2 hr	0.8	ND	ND	3.9
	Powder	4% CH <sub>3</sub> COOH	37°C	2 hr	0.3	ND	ND	ND
	Whole	Water	40°C	30 min	ND	ND	ND	ND
Ball 12	Powder	0.07 mol/L HCl	37°C	2 hr	5.8	1.6	ND	ND
	Powder	4% CH <sub>3</sub> COOH	37°C	2 hr	5.8	1.7	ND	ND
	Whole	Water	40°C	30 min	ND	ND	ND	ND

Unit: mg/kg for powder samples and  $\mu\text{g/mL}$  for whole samples

Determination limits of powder samples are listed in Table 7, and those of whole samples are 5.0 (Ba), 5.0 (Cd), 20 (Cr) and 50 (Pb)  $\mu\text{g/L}$ .

討した (Table 8).

ISO 法に準じた方法で、溶媒のみを 0.07 mol/L 塩酸から 4% 酢酸に変更しても、ボール 10 を除いては溶出量にあまり差は見られなかった。ISO 8124-3 では、玩具の一部を飲み込んだ場合を想定して、胃液に近い 0.07 mol/L 塩酸を溶出溶媒にしたと記載されている。しかし、4% 酢酸でもほぼ同等の溶出が見られることから、玩具が胃内に入らなくても、飲食した食品により口腔内が酸性であれば、同様の溶出が起こる可能性が示された。

一方、公定法ではいずれの試料からも金属の溶出は見られなかった。公定法は乳幼児が玩具を口に入れたときの唾液による溶出を想定して溶出溶媒が水のため、金属が溶出しにくいものと推測される。また、ISO 法では試料を粉碎または細切するため、溶出効率が高くなる。

公定法のほうが溶出力は低い、規格値は重金属試験が鉛として  $1 \mu\text{g/mL}$  以下、カドミウムが  $0.5 \mu\text{g/mL}$  以下であり、一方 ISO の規格値は鉛 90 mg/kg、カドミウム 75 mg/kg である。測定方法や単位の違いがありそのまま比較することはできないが、我が国の規格が緩いとは言いつれない。しかし、両試験法の長所および短所を踏まえてさらに検討を行う必要があろう。

## 結 論

乳幼児用玩具について、有害性の高いアンチモン、ヒ素、バリウム、カドミウム、クロム、鉛、水銀およびセレンの 8 元素を分析したところ、バリウム、鉛、クロム、

カドミウムおよびアンチモンの 5 元素が検出された。このことから、乳幼児用玩具では塗料および着色料として金属顔料が汎用されており、有害元素が含有されていることが示された。そこで、これらの試料について ISO 8124-3 に準拠した溶出試験法を適用したところ、バリウムのほかカドミウム、クロムおよび鉛の溶出が認められたが、いずれも ISO 規格値よりはるかに低いものであった。また、我が国の食品衛生法の玩具の溶出試験と比べると、溶出力は ISO 法のほうが強かったが、規格値、試験方法などに大きな相違があり、簡単には比較できないと考えられた。しかし、ISO 8124 は玩具の安全性に関する国際標準であり、社団法人日本玩具協会では、玩具の塗装およびインクに関する自主基準としてすでに ISO 8124 を採用している<sup>2)</sup>。今後、玩具規格について国際調和の観点を含めて検討が必要であろう。

## 謝 辞

本研究は、平成 14 年度厚生労働科学研究補助金食品・化学物質安全総合研究事業「食品用器具・容器包装等の安全性確保に関する研究」により行った。

## 文 献

- 1) ISO, International Standard ISO 8124-3 Safety toys Part 3: Migration of certain elements, International Organization for Standardization, 1997.
- 2) 社団法人日本玩具協会 “ST 基準第 3 部化学的特性” 2001.

## 報 文

ラップフィルムおよびキャップシーリング中の  
エポキシ化大豆油およびエポキシ化亜麻仁油の分析

(平成 17 年 11 月 11 日受理)

菅野 慎二\* 河村 葉子\*† 六鹿 元雄\* 棚 元 憲 一\*

## Determination of Epoxidized Soybean Oil and Linseed Oil in Wrapping Film and Cap Sealing

Shinji KANNO, Yoko KAWAMURA†, Motoh MUTSUGA and Kenichi TANAMOTO

(\*National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; †Corresponding author)

A determination method was developed for epoxidized soybean oil (ESBO) and epoxidized linseed oil (ELO), which are used as plasticizers and/or stabilizers, in wrapping film and cap sealings. The ESBO method reported by Castle *et al.* was improved. Samples were extracted with acetone-hexane (3:7), transmethylated under alkaline conditions, then derivatized to the 1,3-dioxolanes and analyzed by GC/MS. The recoveries of spiked ESBO and ELO were between 92.6% and 104.4%. The determination limits were 0.01 mg/g for ESBO and 0.02 mg/g for ELO in the wrapping film, and 0.04 mg/g and 0.08 mg/g in the cap sealing. ESBO and ELO were surveyed in 10 samples each of wrapping film and cap sealings currently available on the Japanese market. ESBO was found at 34.7–82.8 mg/g in polyvinyl chloride (PVC) wrapping films and at 5.47–399 mg/g in cap sealings. ELO was detected at 8.6–11.4 mg/g in polyvinylidene chloride (PVDC) wrapping films, and at 46.4 mg/g in a PVC wrapping film.

**Key words:** ラップフィルム wrapping film; キャップシーリング cap sealing; エポキシ化大豆油 epoxidized soybean oil; エポキシ化亜麻仁油 epoxidized linseed oil; 可塑剤 plasticizer; 安定剤 stabilizer; ポリ塩化ビニル polyvinyl chloride; ポリ塩化ビニリデン polyvinylidene chloride

## 緒 言

エポキシ化大豆油 (ESBO) は、ポリマーに柔軟性を与える可塑剤としての特性と、ポリマーから遊離する塩素をトラップしてポリマー鎖の切断および脆弱化を防ぐ安定剤としての特性を併せ持つ添加剤である。また、耐熱温度が高く、原料が大豆油であることから安全性が高いと考えられ、食品用途のポリ塩化ビニル (PVC) 製ラップフィルムや瓶詰キャップのシーリングなどに使用されている。

原料である大豆油の平均的な脂肪酸組成はパルミチン酸 10.3%、ステアリン酸 3.8%、オレイン酸 24.3%、リノール酸 52.7%、リノレン酸 7.9% である。ESBO はオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸の二重結合を、過酸化水素や過酸化酸などの活性酸素によりエポキシ化して製造される。その構造は Fig. 1 に示すように 3 分子の脂肪酸がグリセロールにエステル結合しており、結合する脂肪酸の組み合わせによるさまざまなトリアシルグリセロールの混合物である。

ヨーロッパでは、PVC 製キャップシーリングから移行

した瓶詰ベビーフード中の ESBO について調査が行われており、Castle ら<sup>1)</sup>、Hammarling ら<sup>2)</sup>、英国農漁業食糧省 (MAFF)<sup>3)</sup>、Fantoni ら<sup>4)</sup> などの報告がある。Fantoni ら<sup>4)</sup> の報告では、瓶詰ベビーフード 248 検体のうち 95 検体から ESBO が検出され、その最高濃度は 135 mg/kg であり、試料の約 15% は 30 mg/kg 以上、約 4% はプラスチックの総移行量試験の限度値である 60 mg/kg を上回った。

一方、欧州委員会の食品科学委員会 (SCF) は ESBO の安全性評価を行い、ラットの 2 年間反復投与試験の最大無毒性量 (NOAEL, 140 mg/kg 体重/日) から耐容一日摂取量 (TDI) として 1 mg/kg 体重/日を設定している。

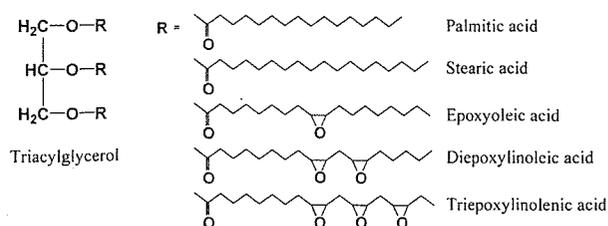


Fig. 1. Structure of components of epoxidized soybean oil (ESBO) and epoxidized linseed oil (ELO)

† 連絡先

\* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1