

Table 2. Migration test of Cd and Pb from paint films according to the ISO 8124-3 method

Sample	Element	Limit	Migration level		
			Water	4% CH ₃ COOH	0.07 mol/L HCl
Vinyl chloride resin enamel	Cd	75	<5	850	310
	Pb	90	<5	370	320
Acrylic resin enamel	Cd	75	<5	950	910
	Pb	90	<5	220	480

Unit: mg/kg in paint film

Limit: Migration limit using 0.07 mol/L HCl at 37°C for 2 hours set for paint on baby toys

果、アクリル樹脂塗料では Cd, Pb とともに溶出が見られ、4% 酢酸より 0.07 mol/L 塩酸のほうが高い溶出量を示した。食品衛生法の規格値をそのまま適用するならば、Cd では 0.5 µg/mL の 3 倍および 4.6 倍に達しており規格値を超過する。しかし、Pb では規格値 1.0 µg/mL の 1/3 および同量であり、規格値以下であった。

一方、塩化ビニル樹脂塗料では、酸性溶媒であっても Cd や Pb の溶出は見られなかった。塗膜がアクリル樹脂塗料よりも堅固で溶媒が浸透できなかつたものと推測された。

2. ISO 規格に準拠した溶出試験

前項と同じ試料について、ISO 8124-3 に準じて溶出試験を行った (Table 2)。

規格どおりの 0.07 mol/L 塩酸を用いて試験を行うと、いずれの塗料においても高い溶出が認められ、溶出量は Cd で 310 および 910 mg/kg, Pb で 320 および 480 mg/kg であった。これらはいずれも ISO 規格値の Cd 75 mg/kg, Pb 90 mg/kg を 3.5~12 倍超過していた。また、溶出溶媒を 4% 酢酸に代えてもほぼ同等の多量の溶出が認められた。

ただし、塩化ビニル樹脂塗料の Pb およびアクリル樹脂塗料の Cd では 4% 酢酸と 0.07 mol/L 塩酸でほぼ同じ溶出量が得られたが、塩化ビニル樹脂塗料の Cd とアクリル樹脂塗料の Pb では 2 倍以上異なり、しかも酸により異なる結果が得られた。これらは塗膜の乾燥や粉砕の状態、添加された金属の均一性などにより生じたばらつきと考えられる。

また、Cd が Pb よりも高い溶出量を示したのは、添加に用いた炭酸カドミウムがクロム酸鉛より酸に対する溶解性が高いためと推測された。

これらの酸性溶媒による溶出量は塗膜中の含有量の 20~90% に相当し、溶出力が極めて高いと考えられる。しかし、前報¹⁾の市販玩具の塗膜を用いた試験では、溶出量は含有量の 2.3% に過ぎなかった。本法では塗膜を一晚乾燥して試験に供したが、さらに時間が経つことで脱水が進んでより堅固な塗膜となり、溶出率が大幅に低下すると考えられた。

一方、溶出溶媒に水を使用すると、食品衛生法と同様にいずれの条件でも定量限界以下であり、Cd や Pb の溶出は認められなかった。塗膜が粉状であっても水ではほとん

ど溶出しないことが示された。

考 察

食品衛生法に従い塗膜を水に 40°C 30 分間浸漬した場合、いずれの塗料および金属でも溶出は見られず、食品衛生法の規格値とのマージンは少なくとも Cd で 5 倍、Pb で 10 倍以上であった。一方、ISO 規格に従い塗膜を粉砕して 0.07 mol/L 塩酸を用い 37°C で 2 時間抽出した場合には、すべての塗料および金属とも規格値を超える溶出が認められ、規格値の超過率は Cd で 4.1 および 12 倍、Pb で 3.5 および 5.3 倍であった。それぞれの規格値と溶出量のマージンをかけあわせると、Cd の塩化ビニル樹脂塗料で 20 倍、アクリル樹脂塗料で 60 倍、Pb ではそれぞれ 35 倍と 53 倍以上の差が少なくともあると考えられる。すなわち ISO はいずれの条件でも食品衛生法より 20 倍以上厳しい規格であることが確認された。

一方、食品衛生法の試験法において、溶媒である水を酸性の 4% 酢酸や 0.07 mol/L 塩酸に変更すると、アクリル樹脂塗料では溶出が認められ、カドミウムでは規格値を超過した。しかし、塩化ビニル樹脂塗料ではいずれも定量限界以下であり、溶出は改善されなかった。塩化ビニル樹脂の塗膜表面は堅固であるため溶出溶媒を浸透せず、塗膜を粉砕することが必須であると判断された。

結 論

Cd および Pb を高濃度に含有する塩化ビニル樹脂およびアクリル樹脂塗膜を用いて比較検討したところ、食品衛生法の塩化ビニル樹脂塗料の試験に比べて、ISO 8124-3 の塗膜の試験が少なくとも 20 倍以上厳しい規格であることが判明した。また、食品衛生法で溶出溶媒を酸性溶媒に変更しても、ISO 規格とはまだ大きな差があることが確認された。

以上のように ISO 規格が食品衛生法よりも厳しい規格であること、国際標準としてすでに各国で受け入れられていることなどから、この規格を食品衛生法の規格基準に導入することが適当であると判断された。

厚生労働省は平成 20 年 3 月 31 日付厚生労働省告示第 153 号によりおもちゃの規格基準改正を行い、新たにこの ISO 規格に基づいた塗膜の規格を導入した。

謝 辞 本研究は、平成19年度厚生労働科学研究補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「食品用器具・容器包装、乳幼児用玩具および洗浄剤の安全性確保に関する研究」により実施した。

文 献

- 1) Kawamura, Y., Kawasaki, C., Mine, S., Mutsuga, M., Tanamoto, K. Contents of eight harmful elements in baby toys and their migration tests. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 51-57 (2006).

Cell transformation activities of abietic acid and dehydroabietic acid: safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use

K. Ohmori^{a*} and Y. Kawamura^b

^aChemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa, Japan; ^bNational Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

(Received 14 February 2008; final version received 11 September 2008)

Abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA) have been detected in virgin paper products and recycled paper products used for food packaging. In order to evaluate the cell transformation activities of AA and DHA, the Bhas 42 cell-transformation assay for initiation and promotion was carried out. Tested in the initiation stage, AA and DHA did not significantly increase transformation frequencies. On the other hand, both chemicals induced transformed foci dose dependently at the promotion stage. The highest transformed foci density induced by AA was about 13 foci/well at 60 nmol ml⁻¹, and that of DHA was about 16 foci/well at 40 nmol ml⁻¹ (solvent control = 2.3 ± 1.4 foci/well). The present results suggest that AA and DHA may have tumour-promoting potential.

Keywords: abietic acid; dehydroabietic acid; cell transformation; Bhas 42 cells; tumour promotion; genotoxicity; paper; paperboard; food packing; recycling

Introduction

Abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA) (Figure 1) are major components of the resin of a needle-leaf tree (Liss et al. 1997). This resin is used to improve the water-resistance qualities and the intensity of paper products as a sizing agent during the production process, and is also used widely in the manufacture of gum-base, soap, paints, adhesive, printing inks and coatings. DHA is generated by the oxidative decomposition of AA by microorganisms (Zanella 1983; Volkman et al. 1993; Wang et al. 1995). It was reported that AA and DHA were detected in all recycled paper products tested and frequently in virgin paper products (Ozaki et al. 2005, 2006). These reports suggested that AA and DHA in paper products arise from the added resin rather than from the pulp. It was further reported that AA and DHA are genotoxic in the rec-assay using *Bacillus subtilis* (Ozaki et al. 2005) and in the mouse lymphoma assay (MLA) (Toxicology Data Network (Toxnet) n.d.), but non-genotoxic in Ames assay using the *Salmonella*/mammalian microsome assay (Nestmann et al. 1979).

Various screening methods, such as the Ames assay, micronucleus assay, chromosome aberration assay and MLA, are currently used to predict the carcinogenicity of chemicals. However, it has become a major issue that among carcinogenic substances there are many that have scored negatively in existing genotoxicity assays.

Non-genotoxic mechanisms, which are at least initially independent of direct DNA damage, can play a causal role in carcinogenesis (Combes 1997). Also, it is predicted that among these non-genotoxic carcinogens, many will be tumour promoters. There is thus a need for assays to predict the tumour-promoting activity of chemicals. Therefore, Ohmori et al. (2004) worked to establish a short-term assay for the detection of the cell-transformation activity of chemicals (Bhas 42 cell-transformation assay) at a tumour promotion-mimicking stage by using Bhas 42 cells (Bhas promotion assay). This assay has many advantages: (1) treatment with an initiating agent and subsequent cultivation for the expression period can be omitted, (2) the experimental period is 2.5–3 weeks after cell inoculation, and (3) the transformation frequency is high, and therefore only one six-well plate is required for each dose. In order to gain wider awareness of this method, an inter-laboratory collaborative study on the Bhas promotion assay was carried out among 14 laboratories belonging to the Non-Genotoxic Carcinogen Study (NGCS) Group in the Environmental Mutagen Society of Japan (Ohmori et al. 2005). The study revealed a high rate of consistency and sensitivity for this promotion assay. Subsequently, the Bhas 42 cell-transformation assay for predicting tumour initiation activity was developed (Asada et al. 2005). The Bhas 42 cell-transformation assay was introduced as a sensitive

*Corresponding author. Email: ohmori.n4yf@pref.kanagawa.jp

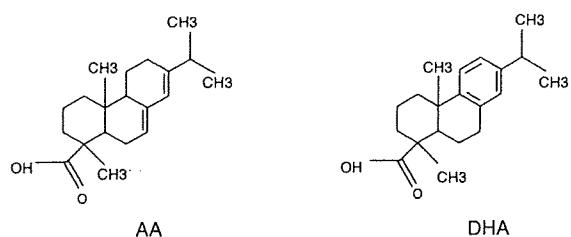


Figure 1. Chemical structures of abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA).

cell-transformation method that could detect both tumour initiators and promoters in the review paper by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2007). In the present study, in order to evaluate the cell transformation activities of AA and DHA, the Bhas 42 cell-transformation assay for both initiating and promoting activity was used.

Materials and methods

Materials

Solvents and reagents

Abietic acid (AA) was purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd (Tokyo, Japan); dehydroabietic acid (DHA), 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) and 3-methylcholanthrene (MCA) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka, Japan). Dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.9%) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

Methods

Media, cells and culture conditions

MEM was obtained from Nissui Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan). DMEM/F12 was supplied by GIBCO Laboratories (Grand Island, NY, USA), and foetal bovine serum (FBS) was purchased from Moregate Exports Pty Ltd (Bulimba, Australia). Bhas 42 cells were established by the transfection of BALB/c 3T3 cells with *v-Ha-ras* and pSV2-*neo* plasmid DNA (Sasaki et al. 1988). Bhas 42 cells were routinely cultured in a medium consisting of MEM supplemented with 10% FBS (M10F) at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells – not permitted to exceed 60–70% confluence – were subcultured by use of 0.25% trypsin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Plastic culture dishes and plates were purchased from Sumitomo Bakelite (Tokyo).

Cell transformation test at initiation stage

M10F medium was used for routine cultivation, while DMEM/F12 + 5% FBS (DF5F) medium was used for transformation experiments and for mother culture.

A cell suspension of 2×10^3 cells ml⁻¹ was prepared from mother culture, and 2 ml distributed into each well of six-well plates (4×10^3 cells/well). In assaying test chemicals, each dose group consisted of six wells. After cultivation for one day, medium was replaced with fresh medium containing test chemical. The final concentration of DMSO in medium was less than 0.1%. The cultures were provided fresh DF5F medium alone on days 7, 11, and 14. On day 21, cells were fixed with methanol for 10 min and stained with 5% Giemsa solution for 30 min. Transformed foci were characterized by the following morphological criteria: deep basophilic staining, dense multilayering of cells, random orientation of cells at the edge of foci, and more than 50 cells within a focus.

Cell toxicity test at initiation stage

The original assay protocol (Asada et al. 2005) was employed, with several modifications, as follows. Concurrent cell growth assay was performed by preparing additional six-well plates and treating the cells as in the transformation assay. Crystal violet (CV) method was employed as described previously (Ohmori et al. 2004). On day 0, a 2 ml suspension of Bhas 42 cells in DF5F at 2×10^3 cells ml⁻¹ was distributed into each well of six-well plates (4×10^3 cells/well). On day 1, medium in each well was replaced with medium containing test chemicals. Three wells were used for each dose group. On day 4, medium in each well was replaced with fresh DF5F medium alone. On day 7, the cells were fixed with 10% formalin for 30 min, washed with water, and stained with 0.1% CV solution for 30 min. After thorough rinsing with water, the plates were dried. Cell-stained CV in each well was extracted with 2 ml of a solution consisting of 0.02 mol l⁻¹ HCl-50% ethanol. The optical density of each extract was measured at 570 nm.

Cell transformation test at promotion stage

The original Bhas 42 cell promotion assay protocol (Ohmori et al. 2004, 2005) was employed, with several modifications, as follows. A suspension of 7×10^3 cells ml⁻¹ in DF5F medium was prepared from mother culture, and 2 ml distributed into each well of six-well plates (1.4×10^4 cells/well). In assaying test chemicals, each dose group consisted of six wells. After cultivation for 4 days, medium was replaced with fresh DF5F medium containing test chemical. The final concentration of DMSO in medium was less than 0.1%. The cultures were again provided fresh medium containing test chemicals on days 7 and 11, and then fresh DF5F medium alone on day 14. On day 21, cells were fixed with methanol for 10 min and stained with 5% Giemsa solution for 30 min. Transformed foci were

characterized by the same morphological criteria as listed in the initiation stage protocol.

Cell toxicity test at promotion stage

On day 0, a 2 ml suspension of Bhas 42 cells in DF5F at 7×10^3 cells ml^{-1} was distributed into each well of six-well plates (1.4×10^4 cells/well). On day 4, medium in each well was replaced with medium containing test chemicals. Three wells were used for each dose group. On day 7, the cells were fixed and stained as described in the cell toxicity test at initiation stage.

Statistical analysis and criteria of judgement

The following criteria were used for the evaluation of transformation results: (1) a significant increase by a one-sided Dunnett test with a significance level of 5% ($p < 0.05$); and (2) a more than two-fold increase as compared with the solvent control. A chemical that satisfied these two criteria was judged to be positive (+). If only the first criterion was met, the chemical was judged as equivocal (\pm). A negative chemical was one that induced no statistically significant increase of transformed foci at any concentration.

Results

Cell toxicity and cell transformation activity at initiation stage

The cell toxicity and cell transformation activity at the initiation stage in Bhas 42 cells were examined (Figure 2). On days 1–4, Bhas 42 cells were exposed to AA or DHA in the concentration range 10–100 nmol ml^{-1} . The relative cell viability with AA at 100 nmol ml^{-1} was 87%, and that with DHA at the same concentration was 36% versus solvent control.

Thus, DHA was more toxic at this dose than AA in the initiation stage. In the cell transformation test at initiation stage, the transformation frequencies with AA and DHA did not increase significantly. Therefore, AA and DHA were judged as negative for initiating activity. The average number of foci per well was 3.5 ± 2.4 in the solvent control and 32.5 ± 5.1 in cultures treated with $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (3.7 nmol ml^{-1}) MCA as a positive tumour initiator control.

Cell toxicity and cell transformation activity at promotion stage

At the promotion stage, the cell toxicity and cell transformation activity of AA and DHA in the concentration range 10–100 nmol ml^{-1} were examined (Figure 3). There were no significant decreases of the relative cell viabilities with AA and DHA up to 100 nmol ml^{-1} . In the cell transformation test at the promotion stage, AA induced transformed foci dose-dependently in the concentration range 20–60 nmol ml^{-1} , reaching about 13 foci/well at 60 nmol ml^{-1} (versus 2.3 ± 1.4 in solvent control). In the case of DHA, transformed foci were also induced significantly in the concentration range 20–60 nmol ml^{-1} , with a maximum 16 foci/well at 40 nmol ml^{-1} . Therefore, AA and DHA were both judged as positive for promoting activity. The specific activity of the cell transformation was calculated with the least-squares method. For AA, the specific activity in the concentration range 0–60 nmol ml^{-1} was 0.18 foci/ nmol ml^{-1} ($r^2 = 0.973$). For DHA, the specific activity was 0.33 foci/ nmol ml^{-1} in the concentration range 0–40 nmol ml^{-1} ($r^2 = 0.969$). The average number of foci per well in the positive tumour promoter control cultures treated with TPA at 50 ng l^{-1} ($0.081 \text{ nmol ml}^{-1}$) was 15.8 ± 3.2 .

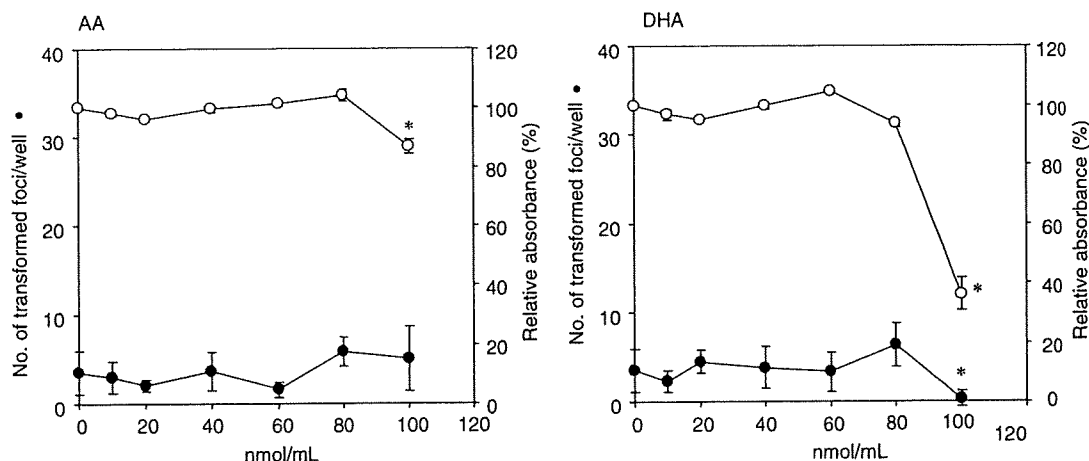


Figure 2. Transformation frequencies and effects on cell growth with abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA) at Bhas 42 cell initiation stage. * $p < 0.05$ versus control.

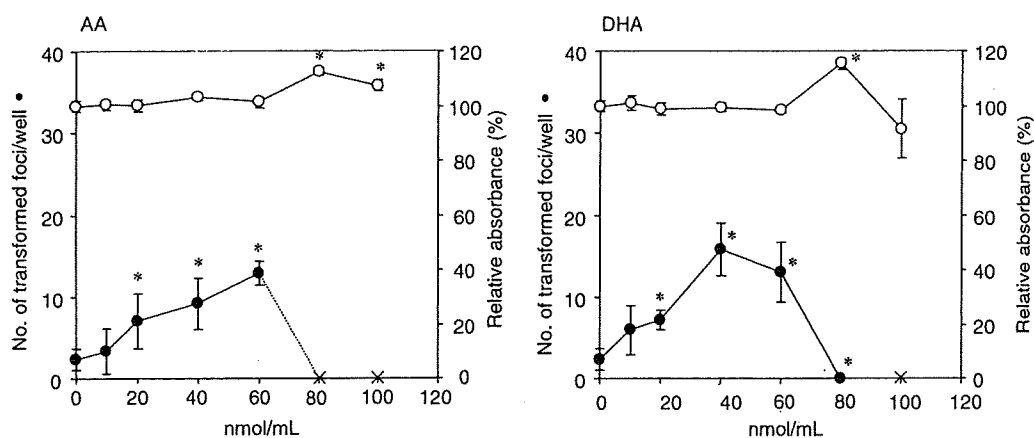


Figure 3. Transformation frequencies and effects on cell growth with abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA) at Bhas 42 cell promotion stage. * $p < 0.05$ versus control. x, Point of cell death because of toxicity.

Discussion

Abietic acid (AA) and dehydroabietic acid (DHA) have been detected in various consumer products including recycled and virgin paper products. Since these compounds may therefore exist in paper and cardboard food packaging, it is important to conduct safety assessments.

Several results regarding genotoxicity testing of AA and DHA have been reported. AA and DHA have been shown to have DNA-damaging activity, with the activity of AA being slightly less than that of DHA in the rec-assay (Ozaki et al. 2005). AA has been judged to be genotoxic in the range $20\text{--}71\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ($66\text{--}235\ \text{nmol ml}^{-1}$) by mouse lymphoma assay in L5178Y cells (TK+/TK-) without metabolic activation (Toxicology Data Network (Toxnet) n.d.). AA and DHA were negative in the Ames test (Nestmann et al. 1979). These results suggest that AA and DHA can induce DNA damage and point mutation. However, AA and DHA had no cell-transformation activity at the initiation stage in the present Bhas 42 cell-transformation assay. It has been reported that cell transformation by treatment with a carcinogen can be assayed simultaneously in the same cultures with other endpoints, including gene mutation, sister-chromatid exchange formation, chromosomal damage, micronucleus induction, and aneuploidy (Landolph 1985; Fritzenschaf et al. 1993; Tsutsui et al. 1997). It has been suggested that AA and DHA have activity-inducible DNA damage and point mutation but not the activity-inducible sister-chromatid exchange formation, chromosomal damage, micronucleus induction, or aneuploidy. It is considered that the difference in the detection mechanisms in these genotoxicity tests leads to a difference in the responses to AA and DHA in these tests. In contrast, AA and DHA-induced transformed foci dose dependently at the promotion stage. It has

been confirmed that the Bhas promotion assay is able to detect tumour promoters, including non-genotoxic carcinogens (Ohmori et al. 2004). Therefore, the present results suggest that AA and DHA might have tumour-promoting potential. Further investigation regarding the development of the metabolic system in the Bhas 42 cell-transformation assay is necessary.

In the Bhas promotion assay, three types of chemicals showing a positive-promoting activity were described (Ohmori et al. 2005). T-type chemicals such as TPA and mezerein induced marked cell growth enhancement, usually to more than 150% of growth in control cell cultures. Induction of transformed foci with these chemicals was observed at concentrations exhibiting growth enhancement. L-type chemicals such as lithocholic acid and okadaic acid induce toxicity in a narrow range of concentrations, and transformed foci are induced at concentrations showing slight to 70% growth inhibition. M-type chemicals such as catechol and progesterone induce transformed foci at test concentrations with little or no growth inhibition. AA and DHA belong to the M-type classification because these chemicals induced transformed foci at test concentrations with no growth inhibition or growth enhancement. At a concentration that had no effect in the cell-toxicity test, Bhas 42 cells were killed with $80\text{--}100\ \text{nmol ml}^{-1}$ AA and DHA in the cell-transformation assay by necrosis or apoptosis. Elucidation of the cause of cell death may provide valuable clues in elucidating the mechanism of tumour promotion in the Bhas cell-transformation assay.

DHA at $40\ \text{nmol ml}^{-1}$ induced approximately 16 transformed foci per well, while TPA – which is a typical tumour promoter – induced approximately 16 transformed foci per well at $50\ \text{ng ml}^{-1}$ ($0.081\ \text{nmol ml}^{-1}$) in the Bhas promotion assay. Thus, the promoting potential of DHA was estimated to be

about 0.2% that of TPA, with AA being slightly less (0.1%) in the twice-repeated experiment. Catechol, which was found to have carcinogenicity at glandular stomach in rats and mice (Hirose et al. 1990) but to not have mutagenicity in *in vitro* and *in vivo* tests, was classified as the M-type in the Bhas cell-transformation assay at the tumour-promotion stage, and the promotion potential of catechol in Bhas 42 cells was 0.1% that of TPA. In addition, progesterone, which has carcinogenicity in ovarian, uterine, and mammary tissue in mouse (International Agency for Research on Cancer (IARC) 1979) but not mutagenicity, was also classified as the M-type in the Bhas cell-transformation assay at the tumour-promotion stage. The promoting potential of progesterone was 0.3% that of TPA. The promoting potentials of DHA and AA were approximately the same as those of catechol and progesterone, which have been reported to be carcinogens based on animal experiments. Therefore, the tumour-promoting potential of DHA and AA in Bhas 42 cells cannot be disregarded.

This initial screening of AA and DHA in the Bhas promotion assay suggests that further studies should be conducted to assess more fully the *in vivo* tumour promotion potential of these chemicals.

Acknowledgement

This work was supported in part by Health Labour Science Research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- Asada S, Sasaki K, Tanaka N, Takeda K, Hayashi M, Umeda M. 2005. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell-transformation assay using *v-Ha-ras*-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res.* 588:7–21.
- Combes RD. 1997. Detection of non-genotoxic carcinogens: major barriers to replacement of the rodent assays. In: Van Zutphen LFM, Balls M, editors. *Animal alternatives, welfare and ethics*. Amsterdam: Elsevier. p. 627–634.
- Fritzenschaf H, Kohlpoth M, Rusche B, Schiffmann D. 1993. Testing of known carcinogens and noncarcinogens in the Syrian hamster embryo (SHE) micronucleus test *in vitro*: correlations with *in vitro* micronucleus formation and cell transformation. *Mutat Res.* 319:47–53.
- Hirose M, Fukushima S, Shirai T, Hasegawa R, Kato T, Tanaka H, Asakawa E, Ito N. 1990. Stomach carcinogenicity of caffeic acid, sesamol and catechol in rats and mice. *Jpn J Cancer Res.* 81(3):207–212.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1979. Progesterone, summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 21. Lyon (France): IARC. p. 491.
- Landolph JR. 1985. Chemical transformation in C3H10T 1/2 CC118 mouse embryo fibroblasts: historical background, assessment of the transformation assay, and evolution and optimization of the transformation assay protocol. In: Kakunaga T, Yamasaki H, editors. *Transformation assay of established cell lines: mechanisms and application*. Scientific Publications No. 67. Lyon (France): IARC. p. 185–203.
- Liss SN, Bicho PA, Saddler JN. 1997. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiol.* 75:599–611.
- 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. *Environ Mutagen.* 1:361–369.
- Ohmori K, Sasaki K, Asada S, Tanaka N, Umeda M. 2004. An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutat Res.* 557:191–202.
- Ohmori K, Umeda M, Tanaka N, Takagi H, Yoshimura J, Sasaki K, Asada S, Sakai A, Araki H, Asakura M, et al. 2005. Inter-laboratory collaborative study of a cell-transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by the non-genotoxic carcinogen study group in Japan. *Alt Lab Anim.* 33:619–639.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. Detailed review paper on cell-transformation assays for detection of chemical carcinogens. Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on Testing and Assessment, No. 31. Paris (France): OECD. p. 1–164.
- Ozaki A, Ooshima T, Mori Y. 2006. Migration of dehydroabietic and abietic acids from paper and paper-board food packaging into food-simulating solvents and Tenax TA. *Food Addit Contam.* 23:854–860.
- Ozaki A, Yamaguchi Y, Fujita T, Kuroda K, Endo G. 2005. Safety assessment of paper and board food packaging: chemical analysis and genotoxicity of possible contaminants in packaging. *Food Addit Contam.* 22:1053–1060.
- Sasaki K, Mizusawa H, Ishidate M. 1988. Isolation and characterization of *ras*-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Jpn J Cancer Res. (Gann).* 79: 921–930.
- Toxicology Data Network (Toxnet). n.d. Chemical Carcinogenesis Research Information System (CCRIS) [Internet]. US National Library of Medicine. Rockville (Maryland) Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html> [Accessed 4 December 1991].
- Tsutsui T, Hayashi N, Maizumi H, Huff J, Barrett JC. 1997. Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister-chromatic exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res.* 373:113–123.
- 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. *J 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. *Appl Environ Microbiol*. 61:222-225.
- Zanella E. 1983. Effect of pH on acute toxicity of dehydroabietic acid and chlorinated dehydroabietic acid to fish and *Daphnia*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 30:133-140.

合成樹脂製器具・容器包装および玩具における
過マンガン酸カリウム消費量および全有機炭素の検討

大野浩之 鈴木昌子 六鹿元雄 河村葉子

Study of Relationship between Consumption of Potassium Permanganate and
Total Organic Carbon on Plastic Kitchen Utensils, Food Packages and Toys

Hiroyuki OHNO^{1,*}, Masako SUZUKI¹, Motoh MUTSUGA² and Yoko KAWAMURA²

¹Nagoya City Public Health Research Institute: 1-11 Hagiya-ma-cho,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan;

²National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

(報 文)

食品衛生学雑誌 第50巻 第5号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienic Society of Japan

Vol. 50, No. 5, October 2009

J. Food Hyg. Soc. Jpn.
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

報 文

合成樹脂製器具・容器包装および玩具における
過マンガン酸カリウム消費量および全有機炭素の検討

(平成 21 年 4 月 13 日受理)

大野浩之^{1,*} 鈴木昌子¹ 六鹿元雄² 河村葉子²Study of Relationship between Consumption of Potassium Permanganate and
Total Organic Carbon on Plastic Kitchen Utensils, Food Packages and ToysHiroyuki OHNO^{1,*}, Masako SUZUKI¹, Motoh MUTSUGA² and Yoko KAWAMURA²¹Nagoya City Public Health Research Institute: 1-11 Hagiya-cho,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan;²National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

Consumption of potassium permanganate and total organic carbon (TOC) were investigated as indices of total organic matter migrated into water from plastic kitchen utensils, food packages and toys for children. The samples were soaked in water at 60 or 95°C for 30 min for kitchen utensils and food packages, and at 40°C for 30 min for toys and the eluates were examined, using the two indices. The quantitation limits were both 0.5 μg/mL. Among 97 kitchen utensils and food packages tested, consumption of potassium permanganate and TOC were 0.5-10.9 μg/mL and ND-18.9 μg/mL for polyvinyl chloride (PVC) tea-pot spouts and nylon kitchen utensils, respectively. Among 32 toys tested, the levels were 0.8-45.5 μg/mL and 0.5-8.9 μg/mL from PVC toys and block toys made by ethylene vinyl acetate resin. The levels for other samples were very low. There were large discrepancies between consumption of potassium permanganate and TOC for some PVC products and nylon kitchen utensils. The cause may be a marked difference of the oxidation decomposition rate by potassium permanganate, depending on the kind of organic matter that migrated from the plastics.

(Received April 13, 2009)

Key words: 過マンガン酸カリウム消費量 consumption of potassium permanganate; 全有機炭素 total organic carbon; 器具 kitchen utensil; 容器包装 food package; 玩具 toy

緒 言

過マンガン酸カリウム消費量は、水中の被酸化性物質によって消費される過マンガン酸カリウムの量を言い、わが国では水中の有機物汚染指標として水質基準などに古くから採用されている試験項目の1つである。器具・容器包装分野においても、昭和41年合成樹脂から溶出する有機物量を規制する必要性から、合成樹脂を水で浸出した試験溶液について水質基準に準じて過マンガン酸カリウム消費量が規制された*¹。この規格は、ホルムアルデヒドを製造

原料とする合成樹脂を除くすべての合成樹脂製器具・容器包装に適用され、基準値は10 μg/mL以下とされた。さらに、昭和47年には、玩具にも適用され、塩化ビニル樹脂塗料およびポリ塩化ビニルを主体とする材料の場合は50 μg/mL以下、ポリエチレンを主体とする材料の場合は10 μg/mL以下と定められた*²。

過マンガン酸カリウム消費量の試験法は、硫酸酸性下で検水に過マンガン酸カリウム溶液を加え煮沸して被酸化性物質を酸化した後、加えた過マンガン酸カリウムに対応する量のシュウ酸ナトリウム溶液を加えて未反応の過マンガン酸カリウムを消失させ、その際に残留するシュウ酸ナトリウムを過マンガン酸カリウムで逆滴定する方法である。この試験法は、有機物の種類によって酸化分解率が大きく

* 連絡先

¹ 名古屋市衛生研究所: 〒467-8615 名古屋市瑞穂区萩山町1-11² 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*¹ 厚生省告示第434号“食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)の一部改正”昭和41年10月4日(1966)*² 厚生省告示第257号“食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)の一部改正”昭和47年8月8日(1972)

異なるため必ずしも有機物量を正しく評価していない、目視による検査方法であるため人為的裁量が入りやすい、個人差が大きい、同一人が実施しても測定精度が悪いなどの指摘がされてきた^{*3}。

一方、全有機炭素 (TOC) は水中に含有される有機物の総量をその主要構成元素である炭素の量で表したものであり、有機物汚染の指標として河川や湖沼などの自然環境水の調査や監視に広く用いられている。平成 14 年度厚生科学研究において TOC が検討され、過マンガン酸カリウム消費量の代替指標として最適であることが報告された^{*3}。これを受けて、平成 15 年新しい水質基準が告示され、平成 17 年 4 月より過マンガン酸カリウム消費量に代わって TOC が水質基準項目に追加された^{*4}。基準値は当初 5 mg/L 以下であったが、平成 21 年より 3 mg/L 以下に引き下げられた^{*5}。

器具・容器包装および玩具における TOC の測定は、ゴム製器具^{1), 2)} やレトルト食品用包装材³⁾ の報告があるのみであり、今までほとんど行われていない。そこで今回、種々の合成樹脂製器具・容器包装および玩具を対象に、それぞれの過マンガン酸カリウム消費量および TOC を調査し、両者の値を比較したので報告する。

実験方法

1. 試料

2006~2007 年に名古屋市内の販売店などから収去または購入した器具・容器包装 97 検体および対象年齢 6 歳未満の乳幼児用玩具 32 検体を用いた。内訳は、器具・容器包装がポリスチレン (PS) 製品 18 検体、ポリエチレン (PE) 製品 15 検体、ポリ塩化ビニル (PVC) 製品 13 検体、ポリプロピレン (PP) 製品 11 検体、ナイロン (PA) 製品 7 検体、アクリロニトリル・ブタジエン・スチレン (ABS) 樹脂およびポリエチレンテレフタレート (PET) 製品各 6 検体、エチレン・酢酸ビニル (EVA) 樹脂、ポリカーボネート (PC) およびポリメタクリル酸メチル (PMMA) 製品各 4 検体、アクリロニトリル・スチレン (AS) 樹脂製品 3 検体、ポリ塩化ビニリデン (PVDC) およびポリメチルペンテン (PMP) 製品各 2 検体、ポリサルホン (PSU) およびポリメタクリルスチレン (MS) 製品各 1 検体の合計 97 検体、玩具が PVC 製品 12 検体、PE 製品 6 検体、EVA 樹脂製品 5 検体、PP 製品 3 検体、PS, ABS 樹脂および天然ゴム (NR) 製品各 2 検体の合計 32 検体である。

2. 試薬および標準溶液

0.05 mol/L シュウ酸ナトリウム溶液および 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液：容量分析用、和光純薬工業(株)製

0.005 mol/L シュウ酸ナトリウム溶液および 0.002 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液：0.05 mol/L シュウ酸ナトリウム溶液および 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液を精製水で 10 倍希釈した。用時調製。

フタル酸水素カリウム：特級、ナカライテスク(株)製

TOC 標準原液：あらかじめ 120°C で 1 時間加熱し、デシケータ中で放冷したフタル酸水素カリウム 2.125 g を精製水に溶かして 1,000 mL とした (炭素濃度として 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

TOC 標準溶液：TOC 標準原液を適宜精製水で希釈して炭素濃度として 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製した。用時調製。

3. 装置および器具

TOC 計：TOC-V CPH (酸化分解方式：燃焼酸化式、二酸化炭素 (CO₂) 検出：非分散型赤外線ガス検出)、(株)島津製作所製

恒温水槽：WH-10-CP 型、(株)ヒラサワ製

4. TOC 計の測定条件

試料導入手量：500 μL 、燃焼酸化触媒：白金 (高感度測定用)、燃焼管温度：680°C、空気流量：150 mL/min、通気時間：1.5 分間

5. 試験溶液の調製

試料を水でよく洗った後、表面積 1 cm² 当たり 2 mL の割合の精製水を用い、器具・容器包装では 60°C (一部の試料は 95°C)、玩具では 40°C でそれぞれ 30 分間浸出し、試験溶液とした。試験溶液は 24 時間以内に過マンガン酸カリウム消費量および TOC の測定に供した。ただし、ラップフィルムについては通常使用前に水洗いすることは考えられないため、使用実態に合わせて水洗いを行わなかった。

6. 過マンガン酸カリウム消費量の測定

試験溶液 100 mL を用い、器具・容器包装の告示法に準じて測定した。ただし、玩具 7 (ボール) については過マンガン酸カリウム消費量が高かったことから試験溶液 50 mL を精製水で 100 mL に希釈したものをを用いて測定した。

7. TOC の測定

試験溶液に 1 mol/L 塩酸を加えて pH 2~3 とした後、高純度空気を通気して試験溶液から無機炭素を除去する酸性化通気処理法により前処理を行った。次いで、無機炭素が除去された試験溶液を高温の白金触媒を充填した燃焼管に注入し、試験溶液中の有機物を構成する炭素を CO₂ に酸化し、生成した CO₂ を非分散型赤外線ガス検出により測定して TOC を求めた。具体的な操作手順としては、マグネットスターラーを入れた 40 mL サンプルバイアルに試験溶液を加え、直ちに密栓し、これを TOC 計に導入した。その後の塩酸添加、通気処理、試料導入、燃焼酸化および CO₂ 検出は自動で行った。

検量線は、炭素濃度として 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TOC 標準溶液を測定し、得られたピーク面積を用いて絶対検量線

^{*3} 平成 14 年度厚生科学研究分担研究報告書 “WHO 飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究” (2003)

^{*4} 厚生労働省令第 101 号 “水道基準に関する省令” 平成 15 年 5 月 30 日 (2003)。

^{*5} 厚生労働省令第 174 号 “水質基準に関する省令の一部を改正する省令” 平成 20 年 12 月 22 日 (2008)

法により作成した。

実験結果および考察

1. TOC の測定

TOC 計は、有機物の酸化方式の違いによって燃焼酸化式と湿式酸化式に分けられる⁴⁾。前者は高温の燃焼管に試料を注入し試料中の炭素を CO₂ に酸化する方式であり、酸化能力が高く、難分解性や不溶性の有機炭素の検出も可能であるため、水道水や河川水など幅広い分野で利用されている。また、装置の保守管理が容易で、さまざまな有機物に対して酸化能力が高く、適用範囲が広い。後者は超純水など低濃度試料の測定に適しているが、ペルオキシ二硫酸ナトリウムの酸化力が燃焼酸化法に比べると弱い。したがって、本試験では燃焼酸化式の装置を用いた。

試験溶液には有機物以外に炭酸塩や溶存 CO₂ などの無機物由来の炭素が存在するため、TOC を求めるには無機炭素量を排除する必要があり、その方法として差し引き法と酸性化通気処理法がある。前者は、試験溶液の全炭素と無機炭素の量をそれぞれ個別に測定し、その差から TOC を求める方法であるが、全炭素と無機炭素の両方に測定誤差が含まれるため、無機炭素が多く TOC が少ない場合には大きな誤差を生じる可能性がある。後者は、試験溶液を通気処理して無機炭素を除去し、試験溶液に残った有機物のみを直接測定する方法であり、TOC に比べて無機炭素が高い場合にも精度よく測定できる。この方法は通気処理の際に揮発性成分も同時に失われる可能性があるため、揮発性有機物を多く含む試料には適さない。合成樹脂製品から溶出する揮発性有機物量は少なく、その損失が TOC へ与える影響は軽微であると考えられるため、本試験では酸性化通気処理法を採用した。

2. TOC の定量限界および再現性

低濃度領域の TOC 標準溶液 0.1, 0.2, 0.5 および 1.0 μg/mL を用い、各濃度において 5 回繰り返し測定を行ったところ、各濃度の変動係数は 28.5, 9.2, 1.6 および 0.4% であった。実際の試験溶液では、濁度成分などの影響を受けて測定精度が低下する可能性があるため、TOC の定量限界は、このような場合を想定し 0.5 μg/mL とした。

そこで、TOC が比較的低い値を示した実試料の試験溶液を用いて 5 回繰り返し測定を行った。器具・容器包装では TOC が 0.5~0.9 μg/mL を示した 5 検体 (No. 32, 64, 66, 70 および 78)、玩具では 0.5~1.2 μg/mL を示した 7 検体 (No. 1, 3, 20, 21, 23, 31 および 32) について検討した。その結果、各試験溶液の変動係数は器具・容器包装では 2.5~5.9%、玩具では 0.2~6.3% であり、0.5 μg/mL 付近の低濃度領域でも良好な再現性が得られた。

また、検量線は炭素濃度として 0.5~50 μg/mL の広い範囲で良好な直線性を示し、今回測定した試験溶液はいずれも希釈操作を行う必要はなかった。

3. 過マンガン酸カリウム消費量の測定

器具・容器包装の過マンガン酸カリウム消費量の測定は現行の告示法に準じて試験溶液 100 mL を用いて行った。一方、玩具の告示法では、試験溶液 50 mL を水で 100 mL に希釈したものをを用いることになっているが*6、今回はできる限り低濃度まで正確に測定するため、器具・容器包装と同様に試験溶液 100 mL を用いて行った。ただし、測定値が 40 μg/mL を超えた No. 7 については上記の希釈操作を行って測定した。

過マンガン酸カリウム消費量の定量限界値は、水質検査では 0.002 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液の最小滴定量 0.05 mL に相当する 0.2 μg/mL に設定されている。しかし、器具・容器包装および玩具の試験では、本試験値から空試験値を差し引く必要があり、この両方に誤差が含まれるため、差し引きすることによってより大きな誤差を生じやすい。このため、本試験では過マンガン酸カリウム消費量の定量限界は余裕をみて 0.5 μg/mL が妥当と判断した。

4. 試料の測定

器具・容器包装 97 検体および玩具 32 検体の測定結果を Table 1 および 2 に示した。

1) 器具・容器包装

PVC 製急須口およびナイロン製器具を除く試料については、過マンガン酸カリウム消費量、TOC ともにほとんどが 1 μg/mL 以下であり、しかもそのうちの約 85% が定量限界未満であった。わずかに EVA 樹脂製保存容器の蓋 2 検体で過マンガン酸カリウム消費量が 1.3 および 1.9 μg/mL、PE 製チーズ用袋 1 検体で TOC が 1.5 μg/mL を示したが、2 μg/mL 以上のものは皆無であり、これらの試料から溶出する有機物量は極めて低濃度であることが確認された。

PVC 製急須口では、過マンガン酸カリウム消費量は 5 検体中 3 検体で 1.0 μg/mL を超え、No. 65, 66 および 67 の値はそれぞれ 8.9, 1.2 および 1.9 μg/mL であった。特に、No. 65 では規格値の範囲内ではあったが高い値を示した。一方、これらの試料の TOC はそれぞれ 1.6, 0.7 および 5.7 μg/mL であった。No. 65 より No. 67 のほうが高い値を示し、過マンガン酸カリウム消費量の値とは異なった傾向が認められた。このことより、No. 65 と 67 から溶出する有機物の種類は異なると推察された。

ナイロン製器具 7 検体では、過マンガン酸カリウム消費量が 0.9~10.9 μg/mL、TOC が 2.9~18.9 μg/mL を示した。No. 95 のフライ返しを除く 6 検体はいずれも過マンガン酸カリウム消費量よりも TOC のほうが高く、特に、No. 94 は過マンガン酸カリウム消費量が 1.6 μg/mL であったのに対して TOC は 18.9 μg/mL と非常に高い値を示した。一方、No. 95 だけは過マンガン酸カリウム消費量が 10.9 μg/mL と規格値を超えたのに対して TOC は

*6 厚生労働省告示第 201 号 “食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 18 年 3 月 31 日 (2006)

Table 1. Consumption of potassium permanganate and TOC of the extracts from kitchen utensils and food packages

Sample No.	Product	Material	Consumption of potassium permanganate ($\mu\text{g/mL}$)	TOC ($\mu\text{g/mL}$)
1	Bucket (Chinese noodle)	PE	ND	ND
2	Pouch packaging	PE	ND	ND
3	Bottle (Sauce)	PE	ND	ND
4	Plastic bag (Pork)	PE	ND	ND
5	Plastic bag (Cooking oil)	PE	ND	ND
6	Plastic bag (Cooking oil)	PE	ND	ND
7	Plastic bag (Orange)	PE	0.5	ND
8	Plastic bag (Orange)	PE	ND	ND
9	Plastic bag (Cheese)	PE	0.8	1.5
10	Plastic bag (Home use)	PE	ND	ND
11	Plastic bag (Home use)	PE	0.5	ND
12	Plastic bag (Home use)	PE	ND	ND
13	Plastic bag (Home use)	PE	ND	ND
14	Wrapping film	PE	ND	ND
15	Wrapping film	PE	ND	ND
16	Lid (Lunch box)	EVA resin	0.6	ND
17	Lid (Storage container)	EVA resin	1.3	ND
18	Lid (Storage container)	EVA resin	1.9	ND
19	Lid (Storage container)	EVA resin	ND	ND
20	Lid (Lunch box)	PMP	ND	ND
21	Wrapping film	PMP	0.5	ND
22	Tray (Lunch)	PP	ND	ND
23	Tray (Lunch)	PP	ND	ND
24	Tray (Lunch)	PP	0.5	ND
25	Lunch box	PP	ND	ND
26	Tray (Rice)	PP	0.5	ND
27	Storage container (Salad)	PP	ND	ND
28	Cap (Soy sauce bottle)	PP	ND	ND
29	Storage container (Ham)	PP	ND	ND
30	Container (Tofu)	PP	ND	ND
31	Container (Bread)	PP	ND	ND
32	Small plate	PP	ND	0.9
33	Tray (Sushi)	PS	ND	ND
34	Tray (Sushi)	PS	ND	ND
35	Tray (Meat)	PS	ND	ND
36	Tray (Meat)	PS	ND	ND
37	Tray (Japanese cake)	PS	ND	ND
38	Tray (Japanese cake)	PS	ND	ND
39	Tray (Lunch)	PS	ND	ND
40	Tray (Lunch)	PS	ND	ND
41	Tray (Lunch)	PS	ND	ND
42	Tray (Daily dish)	PS	ND	ND
43	Tray (Daily dish)	PS	ND	ND
44	Tray (Tempura)	PS	ND	ND
45	Tray (Shrimp cracker)	PS	0.5	ND
46	Tray (Lemon)	PS	ND	ND
47	Tray (Curry)	PS	ND	ND
48	Cover (Tray for daily dish)	PS	ND	ND
49	Cover (Tray for daily dish)	PS	ND	ND
50	Lid (Lunch tray)	PS	ND	ND
51	Shaker (Yoghurt drink)	AS resin	ND	ND
52	Coffee dripper	AS resin	0.5	ND
53	Measuring cup	AS resin	0.5	ND
54	Measuring cup	ABS resin	ND	ND
55	Disposable cup	ABS resin	ND	ND
56	Lunch box	ABS resin	ND	ND
57	Lunch box	ABS resin	ND	ND
58	Ice cream baller	ABS resin	ND	ND
59	Measuring spoon	ABS resin	0.5	ND
60	Container (Jelly)	PVC	ND	ND

Table 1. (Continued)

Sample No.	Product	Material	Consumption of potassium permanganate ($\mu\text{g/mL}$)	TOC ($\mu\text{g/mL}$)
61	Container (Cake)	PVC	0.6	ND
62	Container (Tartar sauce)	PVC	0.6	ND
63	Container (Salad)	PVC	0.5	ND
64	Container (Cracker)	PVC	0.5	0.6
65	Tea-pot spout	PVC	8.9	1.6
66	Tea-pot spout	PVC	1.2	0.7
67	Tea-pot spout	PVC	1.9	5.7
68	Tea-pot spout	PVC	0.8	ND
69	Tea-pot spout	PVC	0.5	ND
70	Wrapping film	PVC	0.5	0.5
71	Wrapping film	PVC	0.5	ND
72	Wrapping film	PVC	ND	ND
73	Wrapping film	PVDC	ND	ND
74	Wrapping film	PVDC	ND	ND
75	Coffee dripper	PC	ND	ND
76	Coffee dripper	PC	ND	ND
77	Container (Milk powder)	PC	ND	ND
78	Feeding bottle	PC	0.5	0.6
79	Storage container (Rice)	PSU	ND	ND
80	Bottle (Beverage)	PET	ND	ND
81	Bottle (Drinking water)	PET	ND	ND
82	Bottle	PET	ND	ND
83	Bottle	PET	ND	ND
84	Bottle	PET	ND	ND
85	Storage container	PET	ND	ND
86	Soy sauce pot	PMMA	0.5	ND
87	Salt and pepper shaker	PMMA	ND	ND
88	Measuring cup	PMMA	ND	ND
89	Storage container	PMMA	ND	ND
90	Storage container	MS	ND	ND
91	Ladle	PA	1.1	3.7
92	Ladle	PA	4.7	7.7
93	Ladle	PA	1.6	18.9
94	Turner	PA	1.2	3.7
95	Turner	PA	10.9	2.9
96	Cake server	PA	2.2	5.9
97	Paddle	PA	0.9	3.7

PE: polyethylene, EVA: ethylene vinyl acetate, PMP: polymethylpentene, PP: polypropylene, PS: polystyrene, AS: acrylonitrile styrene, ABS: acrylonitrile butadiene styrene, PVC: polyvinyl chloride, PVDC: polyvinylidene chloride, PC: polycarbonate, PSU: polysulfone, PET: polyethylene terephthalate, PMMA: polymethylmethacrylate, MS: polymethacryl styrene, PA: nylon
 Samples were soaked in water at 60°C for 30 min except No. 13, 23, 26, 32 and 41, which were soaked at 95°C for 30 min.
 ND: <0.5 $\mu\text{g/mL}$

2.9 $\mu\text{g/mL}$ と比較的低く、他のナイロン製品とは異なっていた。No. 95から溶出した有機物は他のナイロン製品とは異なる種類である可能性が高いと推測された。

2) 玩具

PVC製玩具では、12検体すべてにおいて過マンガン酸カリウム消費量が0.8~45.5 $\mu\text{g/mL}$ 、TOCが1.1~8.9 $\mu\text{g/mL}$ を示した。特に、No. 7のボールは過マンガン酸カリウム消費量が45.5 $\mu\text{g/mL}$ 、TOCが8.9 $\mu\text{g/mL}$ といずれも玩具全体で最高値を示した。ただし、この過マンガン酸カリウム消費量の値はPVC製玩具の規格値(50 $\mu\text{g/mL}$)より低く、食品衛生法には適合していた。両者の測定値を比較すると、人形4検体では、No. 1~3の過マンガン酸カリウム消費量とTOCはほぼ同等程度であった

が、No. 4だけはTOCが5.0 $\mu\text{g/mL}$ で過マンガン酸カリウム消費量の約2.8倍であった。ボール4検体では、いずれも過マンガン酸カリウム消費量のほうが高く、TOCの1.3~5.1倍であった。動物玩具4検体では、No. 9~11はTOCのほうが高く、No. 12だけは過マンガン酸カリウム消費量のほうが若干高い値を示した。

EVA樹脂製のブロック玩具では、5検体すべてにおいて過マンガン酸カリウム消費量が0.8~7.2 $\mu\text{g/mL}$ 、TOCが0.5~2.7 $\mu\text{g/mL}$ を示した。いずれの試料もTOCより過マンガン酸カリウム消費量のほうが高かった。特に、No. 19および22は過マンガン酸カリウム消費量がそれぞれ7.2および6.5 $\mu\text{g/mL}$ と比較的高かったが、TOCは共に2.7 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった。

Table 2. Consumption of potassium permanganate and TOC of extracts from toys

Sample No.	Product	Material	Consumption of potassium permanganate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TOC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Country	Age
1	Doll	PVC	0.8	1.1	China	≥ 3 years
2	Doll	PVC	2.2	1.9	China	≥ 2 years
3	Doll	PVC	0.9	1.2	China	≥ 3 years
4	Doll	PVC	1.8	5.0	China	≥ 6 months
5	Ball	PVC	3.1	2.3	—	≥ 3 years
6	Ball	PVC	6.5	2.9	China	≥ 3 years
7	Ball	PVC	45.5	8.9	China	≥ 3 years
8	Ball	PVC	7.5	2.9	China	≥ 3 years
9	Animal toy	PVC	1.6	2.6	China	≥ 3 years
10	Animal toy	PVC	2.2	7.2	China	≥ 6 months
11	Animal toy	PVC	2.2	4.1	China	≥ 6 months
12	Animal toy	PVC	4.3	3.1	China	≥ 6 months
13	Animal toy	PE	ND	ND	China	≥ 4 years
14	Animal toy	PE	ND	ND	China	≥ 3 years
15	Ball	PE	0.5	ND	China	≥ 3 years
16	Food toy	PE	ND	ND	China	≥ 3 years
17	Toy block	PE	ND	ND	Japan	≥ 6 months
18	Toy block	PE	ND	ND	China	≥ 6 months
19	Toy block	EVA resin	7.2	2.5	China	≥ 3 years
20	Toy block	EVA resin	0.8	0.6	China	≥ 3 years
21	Toy block	EVA resin	1.6	0.5	China	≥ 3 years
22	Toy block	EVA resin	6.5	2.7	China	≥ 3 years
23	Toy block	EVA resin	1.4	0.6	China	—
24	Food toy	PP	0.5	ND	China	≥ 3 years
25	Food toy	PP	ND	ND	Japan	≥ 3 years
26	Food toy	PP	ND	ND	China	≥ 3 years
27	Toy block	PS	ND	ND	China	≥ 3 years
28	Toy block	PS	ND	ND	China	≥ 3 years
29	Toy bugle	ABS resin	0.5	ND	China	—
30	Rattle	ABS resin	0.5	ND	China	≥ 4 years
31	Balloon	NR	1.2	1.2	Malaysia	—
32	Balloon	NR	1.9	1.1	—	—

PVC: polyvinyl chloride, PE: polyethylene, EVA: ethylene vinyl acetate, PP: polypropylene, PS: polystyrene,

ABS: acrylo- nitrile butadiene styrene, NR: natural rubber

Samples were soaked in water at 40°C for 30 min.

ND: <0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

—: no indication

PE, PP および ABS 樹脂製玩具 13 検体では、4 検体が過マンガン酸カリウム消費量 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示したが、その他は過マンガン酸カリウム消費量、TOC 共に定量限界未満であり、溶出する有機物量は極めて低いと推測された。また、天然ゴム製風船では、過マンガン酸カリウム消費量と TOC に差異は見られず、1.1~1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。

5. 過マンガン酸カリウム消費量および TOC の相違

前記の厚生科学研究分担研究報告書によると、水道原水および浄水の全国調査の結果、過マンガン酸カリウム消費量と TOC の相関は、原水では $y = 0.30x + 0.35$ ($r^2 = 0.632$)、浄水では $y = 0.47x + 0.35$ ($r^2 = 0.588$)、全体では $y = 0.31x + 0.57$ ($r^2 = 0.735$) といずれも良好な回帰直線と相関関係が認められている*3。今回の器具・容器包装および玩具 129 検体についても両者の相関を調べたところ (Fig. 1), $y = 0.24x + 0.58$ ($r^2 = 0.202$) となり、水道原水および浄水ほどの相関関係は認められなかった。特に、前述したように PVC 製品やナイロン製器具の一部試料におい

て両者の値が大きく食い違う場合が見られた。

また、同報告書では、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ラウリル硫酸ナトリウム、ノニルフェノール、安息香酸ナトリウム、サリチル酸、ラクトース、フタル酸水素カリウム、デンプンなどのモデル有機化合物を対象として、過マンガン酸カリウム消費量と TOC の各測定値から理論炭素濃度に対する割合を検討している。その結果、TOC の測定値は、理論値に対してフェニルアラニンで 2 倍、ラウリル硫酸ナトリウムで約 1/2 倍であった以外はほぼ一致したのに対し、過マンガン酸カリウム消費量では理論値と一致したのはラクトースのみで、その他は理論値の 1.5% (安息香酸ナトリウム) ~ 918% (トリプトファン) と大きく異なることが示された*3。また、馬場らはシリコンゴムから溶出する安息香酸類が過マンガン酸カリウムによってはほとんど酸化されないことを報告している¹⁾。このように、過マンガン酸カリウム消費量は TOC とは異なり、有機物の種類によってはほとんど酸化されないものから酸化されやすいものまで多種多様であ

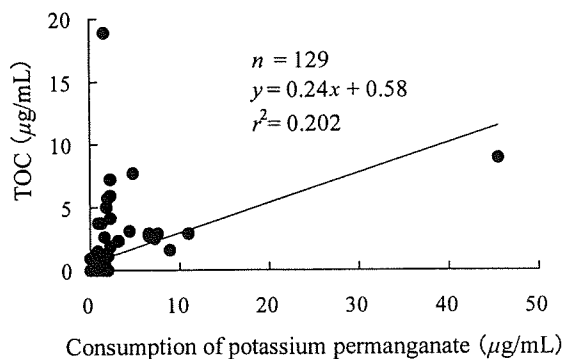


Fig. 1. Correlation between consumption of potassium permanganate and TOC

り、理論値を大きく逸脱することがある。

合成樹脂にはモノマーをはじめ、ダイマー、トリマーなどの材質関連の有機物や可塑剤、安定剤、着色料などの添加剤などが数多く残存している。その一部が水溶出されるが、溶出される有機物の種類は樹脂や製品ごとにさまざまである。したがって、今回判明した両者の相違の原因は、これらの有機物の種類によって過マンガン酸カリウムの酸化分解率が大きく異なることによるものと推測された。

結 論

器具・容器包装 97 検体および玩具 32 検体について、過マンガン酸カリウム消費量と TOC を測定し比較したところ、PVC 製急須口、ナイロン製器具および PVC 製各種玩具において両者の値が大きく食い違う場合が認められた。この原因は、溶出する有機物の種類によって過マンガン酸カリウムの酸化分解率が大きく異なることによるものと推測され、過マンガン酸カリウム消費量では合成樹脂から溶出する有機物総量を正しく評価できない場合があった。さらに、過マンガン酸カリウム消費量は人為的裁量が入りやすく、個人差も大きく、測定精度が低いのに対し、TOC は有機物の種類や化学的特性にかかわらず酸化分解率が安定しているため、過マンガン酸カリウム消費量の代替試験法として有機物総量の把握に適していた。

以上のことより、合成樹脂製器具・容器包装および玩具

の有機物の総量試験には、水質基準と同様に過マンガン酸カリウム消費量を TOC に変更することが望ましいものと考えられる。しかし、器具・容器包装の No. 95 では過マンガン酸カリウム消費量が規格値をわずかながら超過したのに対して TOC は比較的低い値 (2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示した。この場合、現行法では規格違反となるが、TOC では現行の水質基準 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^{*)5} に比べて低く、設定される規格値によっては違反とならない可能性がある。また、No. 93 のように No. 95 とは反対の傾向を示す試料も認められた。今回の検討結果では、このように現行の規格と矛盾を生じる可能性がある試料は PVC およびナイロン製品の一部に限定されることが判明した。今後はこれらの合成樹脂から溶出する有機物を特定し、それらの安全性などを考慮したうえで、試験法の変更について検討する必要がある。

謝 辞

本研究は、平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「食品用器具・容器包装及び乳幼児用玩具の安全性確保に関する研究」により行った。その内容の一部は、日本食品衛生学会第 94 回学術講演会 (2007 年 10 月、静岡) において発表した。

文 献

- 1) Baba, T., Kusumoto, K., Mizunoya, Y. Acidic substances extracted from silicone rubber articles used in contact with foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **20**, 332-337 (1979).
- 2) Baba, T., Hosokawa, M., Yamada, A. Potassium permanganate consumption, TOC, and UV absorption of the aqueous extracts from rubbers. *Seikatsu Eisei*, **29**, 279-284 (1985).
- 3) Uematsu, Y., Ogimato, M., Kabashima, J., Suzuki, K., Kaneko, R., Funayama, K., Haneishi, N., Yasuno, T., Ogino, S. Simulation of migration from a multi-layer laminated film intended for retort foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 133-138 (2005).
- 4) 日本薬学会編 “衛生試験法・注解 2005” 東京, 金原出版, 2005, p. 766-767.

紙製品中の芳香族第一級アミン類の分析

六鹿元雄 李 演揆 河村葉子 棚元憲一

Analysis of Primary Aromatic Amines in Paper Products

Motoh MUTSUGA*, Youn-Kyu LEE, Yoko KAWAMURA
and Kenichi TANAMOTO

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

(報 文)

食品衛生学雑誌 第50巻 第4号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienic Society of Japan

Vol. 50, No. 4, August 2009

J. Food Hyg. Soc. Jpn.
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

報 文

紙製品中の芳香族第一級アミン類の分析

(平成 21 年 1 月 26 日受理)

六鹿元雄* 李 演揆 河村葉子 棚元憲一

Analysis of Primary Aromatic Amines in Paper Products

Motoh MUTSUGA*, Youn-Kyu LEE, Yoko KAWAMURA
and Kenichi TANAMOTONational Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

A highly sensitive analytical method for 25 kinds of primary aromatic amines and azo-dyes in paper products was developed. Free amines and total amines of the samples were analyzed. The amount of each azo-dye was calculated from the amount of total amines by subtracting the amount of free amines. Amines and azo-dyes were migrated into water at 23°C for 24 hours. Free amines were extracted into dichloromethane after alkalization with sodium hydroxide solution. Azo-dyes were reduced to amines with sodium dithionite, alkalized, and then extracted into dichloromethane as total amines. They were determined by GC/MS. The recoveries of 100 µg/kg amines spiked into migration solution were in the range of 69-122%, except for 4,4'-oxydianiline and 4,4'-diaminodiphenylmethane which gave recovery rates of approximately 40%. The determination limits of amines were 4-20 µg/kg in paper. Amines and azo-dyes were surveyed in 17 kinds of base paper and 16 kinds of paper products for food contact use. Aniline was detected at levels of 4-20 µg/kg from most recycled papers, whereas the other amines were not detected in any sample.

(Received January 26, 2009)

Key words: 芳香族第一級アミン primary aromatic amine; アゾ色素 azo-dye; 紙製品 paper product; 再生紙 recycled paper; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

緒 言

芳香族第一級アミン類(PAA)は、アゾ色素、エポキシ樹脂、ポリウレタン、農薬、医薬品などの製造原料として用いられる。そのうち、アゾ色素は一般にPAAのジアゾカップリングによって製造され、繊維、革、化粧品、食品、紙、玩具、医薬品などの着色料として広く使用される。しかし、一部のアゾ色素は代謝による分解でPAAを生成することがある(Fig. 1)。PAAの中には発がん性を指摘されているものが多数あり、IARCは20種類のPAAをグループ1~2Bに分類している。特に2-naphthylamine, 4-aminobiphenylおよびbenzidineの3化合物はグループ1(ヒトに対して発がん性がある)に分類されている。

欧州では1967年の欧州指令67/548/EECにより13種類のPAAを特定アミン類とし、発がん性物質Category 1~3に分類しており、76/769/EECではそれらを含

む製品の販売および使用を規制した。その後、特定アミン類は2002/61/EC(第19次改正)では追加されて22種類となり(Table 1)、皮膚に接触する繊維、革製品などの生活用品から検出されてはならない(検出限界30 mg/kg)とした。

また、食品用途の器具・容器包装に対しては、2002/72/ECでアゾ色素を使用したプラスチック製品からPAA

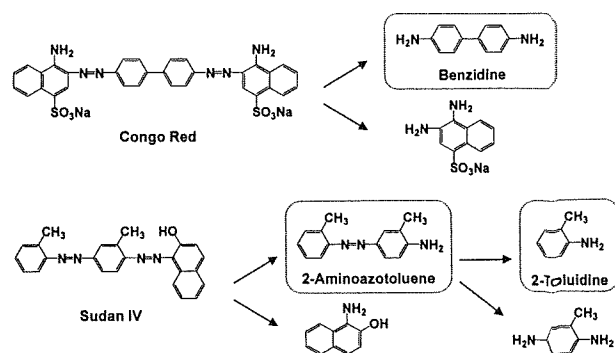


Fig. 1. Reductive cleavage of azo-dyes

* 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

が溶出してはならない（定量限界：アニリンとして食品中に $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）とされ、2007/19/ECにおいて食品に接触するすべてのプラスチック製品からPAAが溶出してはならない（定量限界： $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）と改正された。

EUでは食品用紙製品については規制していないが、欧州評議会では推奨基準として食品接触用途の紙・板紙に関する政策綱領“Resolution AP (2002)”を決議している。その技術文書 No. 3「古紙繊維から成り、食品に接触することを意図した紙・板紙原紙および加工品に関するガイドライン第2版(2005/4/13)」において、再生紙の安全性を保証するための条件の1つとして、特定アミン類またはこれらを生成する可能性があるアゾ色素が紙中に $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上含有されてはならないとしている*1。再生紙には染料・印刷用インクなどの着色料として使用されたアゾ色素が混入する可能性がある。

技術文書 No. 3では紙製品中の特定アミン類やアゾ色素の参考試験法として、ドイツ日用品規則令 § 35 LMBG B 82.02-2 織物中の特定アミン類試験法*2 および L 00.00-6 水性食品擬似溶媒中のPAA試験法*3を示している。しかし、前者はクエン酸緩衝液で抽出し、精製・濃縮後 HPLC-DAD, GC-FID または GC/MS で測定する方法であるが、感度が不十分であり、後者はPAAをアニリンとして定量しているため分別定量することができない。また、前者とはほぼ同じ試験法として、EN 14362 織物-アゾ色素から生成する特定芳香族アミンの定量法¹⁾、ISO 17234 革製品-化学試験-染色された革製品の特定アゾ色素の定量²⁾ などがあるが、同様に感度が不十分である。紙製品の分析については、Brauer ら⁴⁾が § 35 LMBG L 00.00-6 の改良法を報告しているが、個別のPAAは定量できず、感度も十分でない。食品接触用プラスチックについては、Mortensen らが溶出液を LC/MS/MS により直接測定する高感度で簡便な方法⁵⁾を報告しているが、分析装置が高価で十分に普及していないという問題点がある。

今回、汎用性が高く化合物の同定も可能である GC/MS を用い、特定アミン類を含む 25 種類の PAA およびそれらを生成するアゾ色素を高感度に測定できる方法を確立した。さらに、本法を用いてわが国で流通する原紙および紙

製品の分析を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

原紙 17 試料：白板紙 8, 段ボール原紙 6, カップ原紙 1, ドリープ紙 1, グラシン紙 1

食品用紙製品 16 試料：コーヒーフィルター 2, 紙コップ 3, 紙皿 3, 箱 5 (弁当箱 2, その他食品用 3), 袋 2 (フライドポテト用 1, その他食品用 1), ナプキン 1,

食品用途以外の紙製品 13 試料：折込広告 8, 雑誌 3, 箱 2

2. 試薬

PAA 標準品：25 種類（化合物名, CAS 番号, 試薬の純度, 販売会社などは Table 1 に記載）

Congo Red: 東京化成工業(株)製

亜ジチオン酸ナトリウム, 硫酸ナトリウム: シグマアルドリッチジャパン社製

ジクロロメタン: 残留農薬分析用: 和光純薬工業(株)製
各 PAA 標準原液 ($1000 \mu\text{g}/\text{mL}$): 各 PAA 標準品 50 mg にメタノールを加えて 50 mL としたもの

PAA 混合標準原液 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$): 各 PAA 標準原液を 1 mL ずつ混合しジクロロメタンを加えて 100 mL としたもの

PAA 混合標準溶液: PAA 混合標準原液をジクロロメタンで希釈して $0.01 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたもの

3. 装置

恒温槽: BIOTRON LH200, エヌケーシステム(株)製
GC/MS: GC 6890 Series PLUS, MS 5975 以上 Agilent Technologies 社製

遠心濃縮装置: CVE-100 東京理化工機(株)製

4. GC/MS 測定条件

カラム: DB-5MS, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$ (膜厚 $0.25 \mu\text{m}$), 注入量: $1.0 \mu\text{L}$, 注入モード: スプリットレス, 注入口温度: 250°C , キャリヤガス: ヘリウム $1 \text{ mL}/\text{min}$, カラム温度: 50°C (2 min) $\rightarrow 10^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 280^\circ\text{C}$ (5 min) $\rightarrow 20^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 320^\circ\text{C}$ (10 min), 測定モード: SIM, 定量イオン, 確認イオンおよび保持時間は Table 1 参照。

5. 試験溶液の調製

1) 溶出

約 1 cm 角に細切した試料 10 g に水 200 mL を加え、 23°C に設定した恒温槽内に 24 時間放置した。

2) 遊離アミン

溶出液 50 mL に 4% 水酸化ナトリウム溶液 2 mL を加え、ジクロロメタン 25 mL で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで約 0.5 mL に濃縮後、 1 mL 校正目盛付き濃縮管に移した。遠心濃縮装置で乾固させないように濃縮し、ジクロロメタンで 1 mL に定容し試験溶液とした。

*1 Council of Europe: Policy statement concerning paper and board materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, Technical document No. 3—Guidelines on paper and board materials and articles, made from recycled fibres, intended to come into contact with foodstuffs, 2005.

*2 German Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine (BgVV): § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) B 82.02-2 Analysis of commodities—Detection of particular azo dyes used in textile commodities, 1998.

*3 German Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine (BgVV): § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) L 00.00-6, Determination of primary aromatic amines in aqueous food simulants, 1995.

Table 1. Compound specific parameters for 25 amines included in the method

Amine No.	Name	CAS No.	Directive 2002/61/EC*1	IARC group*2	Reagent purity (%)	Reagent supplier*3	Retention time (min)	Quantitative ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)	Determination limit (ng/mL)
1	2-Toluidine	95-53-4	+	2A	>99	A	8.3	106	107	10
2	2-Methoxyaniline	90-04-0	+	2B	>98	A	9.9	123	108	10
3	4-Chloroaniline	106-47-8	+	2B	>98	A	10.3	127	129	10
4	4-Cresidine	120-71-8	+	2B	>97	B	11.3	137	122	10
5	2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7	+	3	—	C	11.6	135	120	10
6	4-Chlorotoluidine	95-69-2	+	2A	>95	A	11.7	141	105	10
7	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	+	2B	>95	A	12.8	121	122	50
8	2,4-Diaminoanisole	615-05-4	+	2B	—	D	14.5	138	123	—*5
9	2-Naphthylamine	91-59-8	+	1	—	—	14-16*4	143*4	115*4	—*5
10	2-Amino-4-nitrotoluene	99-55-8	+	3	>95	A	15.6	152	106	50
11	4-Aminodiphenyl	92-67-1	+	1	—	—	17.3	169	168	10
12	4-Aminoazobenzene	60-09-3	+	2B	>95	A	20.6	197	92	20
13	4,4'-Oxydianiline	101-80-4	+	2B	>99	A	20.8	200	108	50
14	Benzidine	92-87-5	+	1	—	H	21.0	184	92	—*5
15	4,4'-Diaminodiphenylmethane	101-77-9	+	2B	>98	A	21.0	198	182	50
16	2-Aminoazotoluene	97-56-3	+	2B	>97	A	22.3	225	105	10
17	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane	838-88-0	+	2B	>95	A	22.5	226	211	20
18	3,3'-Dimethylbenzidine	119-93-7	+	2B	>97	A	22.7	212	201	10
19	4,4'-Thiodianiline	139-65-1	+	2B	>98	A	23.2	216	184	50
20	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	+	2A	>98	A	24.0	266	231	20
21	3,3'-Dichlorobenzidine	91-94-1	+	2B	>99.9	E	24.0	252	254	10
22	3,3'-Dimethoxybenzidine	119-90-4	+	2B	>95	F	24.1	244	201	50
23	Aniline	62-53-3	—	3	>99	A	6.7	93	66	10
24	1-Naphthylamine	134-32-7	—	3	>99	G	14.8	143	115	10
25	2-Aminodiphenyl	90-41-5	—	—	>98	B	15.5	169	168	10

*1. List of primary aromatic amines in the Directive 2002/61/EC

*2. IARC classification groups: 1 = carcinogenic to humans, 2A = probably carcinogenic to humans, 2B = possibly carcinogenic to humans, 3 = not classifiable as carcinogenic to humans

*3. A) Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., B) Wako Pure Chemical Industries, Ltd., C) AccuStandard Inc. (1 mg/mL solution), D) AccuStandard Inc. (0.1 mg/mL solution), E) SUPELCO, F) Kanto Chemical Co. Inc., G) Aldrich Chemical Co., Inc., H) Prepared from Congo red

*4. Based on 1-naphthylamine data

*5. The determination limit could not be calculated.