

3) 総アミン

溶出液 50 mL に 200 mg/mL 亜ジチオン酸ナトリウム溶液 (用時調製) 5 mL を加え 70°C 10 分間加温した。その後、4% 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を加え、以下遊離アミンと同様にジクロロメタンで抽出し試験溶液を調製した。

4) アミン 14 の生成

1 mg/mL Congo Red 水溶液 50 mL を総アミンと同様に操作してアミン 14 確認用溶液とした。

6. 定 量

PAA 混合標準溶液 1.0 μ L を GC/MS に注入し、得られた各 PAA の定量イオンのピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。総アミンおよび遊離アミンの試験溶液中の各 PAA の濃度を求め、試料量当たりの量 (μ g/kg) を算出した。さらに、総アミンと遊離アミンの溶出量の差をアゾ色素量とした。

結果および考察

1. 測定対象とした芳香族第一級アミン類

欧州指令 2002/61/EC では、Table 1 に示すアミン 1 ~ 22 が特定アミン類として規制対象となっている。そのうち 19 種類については標準品が入手できた。一方、アミン 9, 11 および 14 は IARC によりグループ 1 に分類される発がん物質であるため市販されていない。そこで、アミン 14 はアゾ色素である Congo Red の分解により生成した。また、アミン 9 の代替として異性体のアミン 24 を測定対象に加えた。アミン 11 については保有していた標準品を使用した。一般には入手困難のため異性体のアミン 25 も測定した。その他に PAA の母核であり、ドイツ日用品規則令において特定アミン類の指標物質としても扱われるアニリン (アミン 23) を加え、合計 25 種類の PAA を測定対象とした。

2. GC/MS 測定条件の検討

GC/MS の SCAN モードにより各 PAA 標準溶液を測定し、保持時間、定量イオンおよび確認イオンを求めた (Table 1)。

アミン 10 と 25 は保持時間が近いが、Fig. 2 に示すようにお互いの定量イオンに干渉しないことから分別定量できた。一方、アミン 20 ~ 22 は保持時間がほぼ一致しており、アミン 22 が m/z 252 のフラグメントを生ずることから、アミン 22 が大量に存在する場合にはアミン 21 は定量できなかった (Fig. 3)。しかし、それ以外の場合はいずれのアミンも分別定量が可能であった。

アミン 8, 9 および 14 を除く 22 種類の PAA のトータルクロマトグラムを Fig. 4 に示した。標準溶液における定量限界は 10 ~ 50 ng/mL であった (Table 1)。

アミン 8 は非常に分解しやすいため、保持時間や定量および確認イオンは求められたが、正確な定量限界は測定できなかった。また、標準品が入手できなかったアミン 9 は、異性体のアミン 24 から保持時間、定量および確認イ

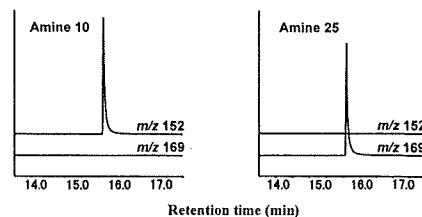


Fig. 2. SIM chromatograms of amines 10 and 25 (2 μ g/mL)

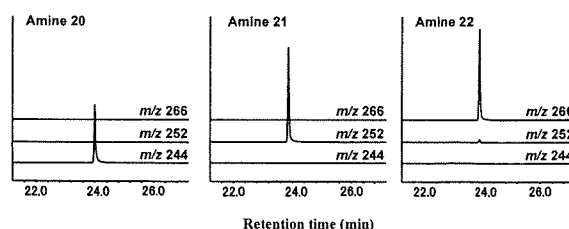


Fig. 3. SIM chromatograms of amines 20, 21 and 22 (2 μ g/mL)

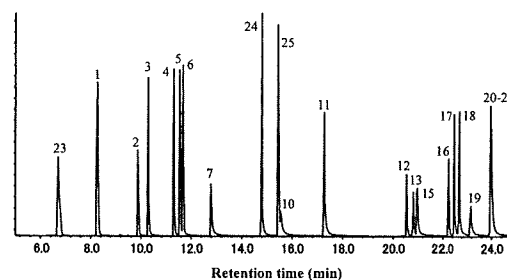


Fig. 4. Total ion chromatogram (SIM) of standard solution (1 μ g/mL)

オンを推定した。定量限界も同程度と推定された。一方、アミン 14 は Congo Red の分解物を用いて保持時間、定量および確認イオンを求めたが、純度が不明のため定量限界は求められなかった。

3. 試験方法の検討

1) 溶出

紙製品からの特定アミン類の溶出法として、ドイツ日用品規制などではクエン酸緩衝液を用いているが、欧州評議会技術文書では、常温使用の場合は EN 645 の溶出法⁵⁾を推奨している。得られた測定値を比較するため、今回は EN 645 の溶出法に準拠し、水を用いて 23°C で 24 時間溶出することとした。

2) 遊離アミン

溶出液からの試験溶液の調製法として、ドイツ日用品規則などでは、試験溶液の調製にケイソウ土カラムによる抽出を行っているが、その場合の定量限界は数十 mg/kg と高く、欧州評議会の推奨基準である 100 μ g/kg まで定量することができない。そこで、ジクロロメタンとの液-液分配により抽出したのち濃縮して測定する方法を検討した。定量可能な 22 種類の PAA のうち構造上安定と考えられる 15 種類を選択し、それら各 0.5 μ g を水 50 mL に添加し、ジクロロメタン 25 mL で 2 回抽出したところ、

いずれの PAA も良好な回収率を示した。しかし、板紙 1 (Board 1) の溶出液に添加すると、アミン 13, 15, 17, 18, 19 および 22 で回収率が大きく低下した (Table 2)。これ

Table 2. Effect of pH on amine recovery from migration solution

Amine No.	Recovery (%)				
	Water		Paper migration solution		
	Not treated	Not treated	pH 8	pH 12	pH 14
2	104	102	96	109	100
3	104	98	97	107	110
4	102	97	92	107	105
6	100	93	92	101	101
7	79	95	78	93	93
11	94	87	89	108	102
13	69	7	46	52	55
15	77	11	52	63	69
17	97	33	78	98	99
18	92	23	60	75	74
19	86	7	39	47	49
20	99	76	86	112	104
21	99	81	84	108	103
22	99	17	69	87	79
24	102	93	88	101	108

0.5 μg of each amine was spiked in 50 mL of water or paper migration solution.

Each value is the mean of two trials.

は PAA が板紙からの溶出物に吸着したためと推定された。そこで、PAA の吸着を抑制するため、4% 水酸化ナトリウム溶液を添加し、pH 8, 12 および 14 に調整したのち、ジクロロメタンで抽出した (Table 2)。その結果、回収率は大幅に改善された。ただし、pH 12 と 14 ではあまり差が見られなかったことから pH 12 以上に調整することとし、4% 水酸化ナトリウム溶液を 2 mL 添加することとした。

3) 総アミン

EN 14362 では溶出液に亜ジチオン酸ナトリウム溶液を加え、加温することによりアゾ色素中のジアゾ結合を還元開裂させアミンとしたのち、溶液を遊離アミンと同様に処理し、アゾ色素由来の PAA と遊離アミンを合わせて総アミンとして定量している。本法でも EN 14362 に従ってアゾ色素の分解を行った。ただし、亜ジチオン酸ナトリウム溶液を添加した後の溶出液の液性は弱酸性 (pH 5) であるため、4% 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を添加して pH 12 以上としたのち抽出を行った。また、アミン 10, 12 および 16 はその構造内にジアゾ結合を有しており、亜ジチオン酸ナトリウム溶液の添加により分解するため測定対象から除外した。

4) 添加回収試験

板紙 1 の溶出液に PAA を 20 または 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加し、遊離アミン 22 種類の回収試験を行った (Table

Table 3. Recoveries of amine spiked in paper migration solution

Amine No.	Free amine (%)		Total amine (%)	Determination limit	
	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Migration solution (ng/mL)	Paper ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	59 \pm 5	85 \pm 6	74 \pm 2	0.2	4
2	62 \pm 6	91 \pm 7	72 \pm 2	0.2	4
3	62 \pm 6	86 \pm 5	70 \pm 2	0.2	4
4	63 \pm 6	94 \pm 6	84 \pm 2	0.2	4
5	59 \pm 6	98 \pm 7	86 \pm 9	0.2	4
6	58 \pm 6	83 \pm 5	67 \pm 1	0.2	4
7	—	105 \pm 7	126 \pm 11	1	20
10	—	115 \pm 10	—	1	20
11	70 \pm 5	94 \pm 1	95 \pm 4	0.2	4
12	85 \pm 6	118 \pm 3	—	0.4	8
13	—	38 \pm 1	37 \pm 17	1	20
15	—	44 \pm 1	64 \pm 23	1	20
16	84 \pm 5	122 \pm 4	—	0.2	4
17	74 \pm 3	83 \pm 4	84 \pm 14	0.4	8
18	58 \pm 3	69 \pm 3	78 \pm 10	0.2	4
19	—	69 \pm 2	54 \pm 13	1	20
20	72 \pm 4	105 \pm 5	91 \pm 7	0.4	8
21	71 \pm 4	105 \pm 4	91 \pm 4	0.2	4
22	—	97 \pm 8	107 \pm 11	1	20
23	59 \pm 5	81 \pm 5	61 \pm 2	0.2	4
24	69 \pm 7	106 \pm 6	90 \pm 3	0.2	4
25	61 \pm 7	99 \pm 6	83 \pm 3	0.2	4

0.05 or 0.25 μg of each amine was spiked in 50 mL of paper migration solution.

Each value is the mean \pm S.D. of three trials.

—: Not examined

3). 板紙1はアニリンを含有するため無添加時の測定値を差し引いて回収率を求めた。回収率は100 µg/kgの添加ではアミン13および15が38および44%と低かったが、それ以外のPAAは69~122%とほぼ良好であった。定量限界が低い16種類のPAAについて20 µg/kg添加したところ、回収率は58~85%であった。

また、総アミン測定法についてもPAAを100 µg/kg添加したところ、回収率はアミン13で37%と低かったが、それ以外のPAAでは54~126%の回収率が得られた。ただし、亜ジチオン酸ナトリウムにより分解するアミン10, 12および16は添加しなかった。

遊離アミンおよび総アミンの両法でともに回収率が低かったアミン13, 15および19は、いずれも分子内にアミノ基を2個有しており、他のPAAと比べイオン化しや

すく、紙からの溶出物に吸着しやすいことが推測された。

今回添加回収試験を行った22種類のPAAの定量限界は、溶出液当たり0.2~1 ng/mL、紙当たり4~20 µg/kgであり、欧州評議会の推奨基準である100 µg/kgの1/25~1/5まで定量可能であった。

4. 原紙および紙製品の調査

1) 原紙

原紙17試料についてPAA溶出量を測定した(Table 4)。その結果、アニリンが遊離アミンで11試料から4~8 µg/kg、総アミンで13試料から4~20 µg/kg検出された。これらはいずれも再生紙であり、再生紙14試料中アニリンが検出されなかったのは1試料のみであった。一方、再生紙でない3試料からはアニリンは検出されなかった。このことからアニリンは古紙の印刷インクなどに

Table 4. Migration of PAA from base paper samples

Sample	Producer	Recycled paper	Free amine (µg/kg)		Total amine (µg/kg)	
			Aniline	Other PAA	Aniline	Other PAA
Board 1	Japan	Y	6	ND	16	ND
Board 2	Japan	Y	6	ND	16	ND
Board 3	Japan	Y	4	ND	10	ND
Board 4	Japan	Y	8	ND	20	ND
Board 5	Japan	Y	8	ND	6	ND
Board 6	Import	Y	ND	ND	ND	ND
Board 7	Import	Y	4	ND	4	ND
Board 8	Import	Y	8	ND	8	ND
Cardboard 1	Japan	Y	6	ND	16	ND
Cardboard 2	Japan	Y	4	ND	10	ND
Cardboard 3	Japan	Y	ND	ND	8	ND
Cardboard 4	Japan	Y	ND	ND	10	ND
Cardboard 5	Japan	Y	6	ND	14	ND
Cardboard 6	Japan	Y	6	ND	16	ND
Board for cup	Japan	N	ND	ND	ND	ND
Parchment	Japan	N	ND	ND	ND	ND
Glassine	Japan	N	ND	ND	ND	ND

ND: Aniline < 4 µg/kg, Other PAA < determination limit, see Table 3

Table 5. Migration of PAA from paper products for food contact use

Sample	Usage	Recycled paper	Print	Free amine (µg/kg)		Total amine (µg/kg)	
				Aniline	Other PAA	Aniline	Other PAA
Filter 1	Coffee	N	—	ND	ND	ND	ND
Filter 2	Coffee	N	—	ND	ND	ND	ND
Cup 1	Beverage	N	—	ND	ND	ND	ND
Cup 2	Beverage	N	—	ND	ND	ND	ND
Cup 3	Fried food	Y	+	ND	ND	8	ND
Tray 1	—	Y	—	ND	ND	ND	ND
Tray 2	—	Y	—	ND	ND	4	ND
Tray 3	—	Y	+	6	ND	6	ND
Box 1	Lunch box	Y	+	8	ND	12	ND
Box 2	Lunch box	Y	+	6	ND	6	ND
Box 3	Pizza	Y	—	6	ND	12	ND
Box 4	Cake	Y	—	4	ND	6	ND
Box 5	Takoyaki	Y	+	10	ND	20	ND
Bag 1	Fried potato	Y	+	ND	ND	ND	ND
Bag 2	Fried food	Y	+	ND	ND	ND	ND
Napkin	—	N	—	ND	ND	ND	ND

ND: Aniline < 4 µg/kg, Other PAA < determination limit, see Table 3

使用されていたアゾ色素に由来すると考えられた。一方、アニリン以外のPAAは遊離アミン、総アミンともにすべての試料で検出されなかった。アゾ色素の溶出量はND~12 µg/kg (アニリンとして)であった。

以上のことから、試料中には分子内にアニリンを含むアゾ色素が微量存在するが、特定アミン類は使用されていないことがわかった。

2) 食品用紙製品

食品用として販売されていた紙製品16試料についてPAA溶出量を測定した(Table 5)。その結果、アニリンは再生紙を使用した11試料では遊離アミンで6試料から4~10 µg/kg、総アミンで8試料から4~20 µg/kg検出された。一方、再生紙を使用していない5試料からは検出されなかった。アニリン以外のPAAは遊離アミン、総アミンともにすべての試料で検出されなかった(Table 5)。

アゾ色素量はND~10 µg/kg (アニリンとして)で原紙とほぼ同じであり、また印刷がなかった7試料からのアゾ色素量は最大でも10 µg/kgであり、これは原紙のアゾ色素量とほぼ同じであった。そのため、これらの試料に使用された印刷インキは特定アミン類やアニリンを含有するアゾ色素ではないことが示唆された。

3) 食品用途以外の紙製品

13種類の食品用途以外の紙製品からの総アミンを測定した結果、アニリンはすべての試料から12~242 µg/kg検出された。その量は原紙や食品用紙製品と比べて高かった。一方、アニリン以外のPAAはすべての試料で検出されなかった(Table 6)。アニリン量が明らかに高いものは特定アミン類以外のアミンを含むアゾ色素が使用されている可能性が示唆されたが、特定アミン類を含有するアゾ色素は使用されていないことがわかった。

結 論

紙製品中のPAAおよびアゾ色素のGC/MSによる分析法を開発した。本法は特定アミン類22種類を含む25種類のPAAのすべての検出および同定が可能で、欧州評議会の推奨基準である100 µg/kgの1/25~1/5まで定量可能であった。

原紙、食品用紙製品および食品用途以外の紙製品の調査を行ったところ、いずれの試料からも特定アミン類は検出されなかった。特定アミン類を含有するアゾ色素は直接印刷インキなどに使用されていないだけでなく、古紙由来の混入もないことが確認された。このことから、古紙由来の特定アミン類やそれらを構造内に含むアゾ色素の混入はほとんどないことが判明した。

一方、アニリンは原紙および食品用紙製品の再生紙試料

Table 6. Migration of PAA from coloured paper not for food contact useSample

	Total amine (µg/kg)	
	Aniline	Other PAA
Leaflet 1	20	ND
Leaflet 2	64	ND
Leaflet 3	52	ND
Leaflet 4	52	ND
Leaflet 5	16	ND
Leaflet 6	12	ND
Leaflet 7	76	ND
Leaflet 8	24	ND
Magazine 1	36	ND
Magazine 2	46	ND
Magazine 3	136	ND
Box 1	242	ND
Box 2	16	ND

ND<determination limit, See Table 3

から高頻度に検出された。しかしアニリンの検出と製品の印刷には相関が認められなかった。また、食品用途以外の紙製品では原紙や食品用紙製品と比べてアニリン量が高かった。このことから、原紙および食品用紙製品のアニリンは古紙に使用された印刷インキや塗工用ワニスのアゾ色素に由来すると考えられた。

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・容器包装および乳幼児玩具の安全性確保に関する研究」により行った。

文 献

- 1) European Committee for Standardization: EN 14362, Textiles methods for the determination of certain aromatic amines derived from azo colorants, 2003.
- 2) ISO: ISO 17234 Specifies a method for detecting the use of certain azo colourants which may release aromatic amines, 2003.
- 3) Mortensen, S. K., Trier X. T., Foverskov, A., Petersen, J. H. Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1091**, 40-50 (2005).
- 4) Brauer, B., Funke, T. Determination of primary aromatic amines after cold water extraction of food contact materials of paper and paperboard. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **97**, 169-171 (2001).
- 5) European Committee for Standardization: EN 645, Preparation of cold water extract, 1994.

