

欧州規格により乳幼児繊維製品(玩具及び衣服)に使用規制されている

着色剤のHPLCによる分析調査

中島晴信^{*1} 山崎勝弘^{*1} 深谷 崇^{*2} 鹿庭正昭^{*3}

In the European Standard EN71 on the "Safety of Toys", 16 kinds of the coloring agents and 9 kinds of the aromatic primary amines for the dyes used in the toys made of textiles are regulated. By adding an artificial saliva, we conducted the dissolution test of the artificial sweat stipulated in "the color fastness test to a sweat of JIS (JIS L 0801:2004)" that was equivalent to the early test of EN71. According to the final test on 16 kinds of the coloring agents, it is stipulated that a qualitative test and a semi-quantitative determination method should first be performed by the photodiode array detection HPLC (HPLC-DAD). Therefore, we examined this analytical method, and then improved its method.

By this improved method, we analyzed the 12 products (20 parts) of the textile products (toys and infant clothes) that were commercially available. As a result, it was found that there were no products matching to the reference products in both the spectrum and retention time, and that any of the regulated coloring agents was not used in the products analyzed.

キーワード：乳幼児繊維製品、染料、着色剤、HPLC-DAD、欧州規格 EN71

key words : textile products for infant and baby, dye, coloring agent, HPLC-DAD, European Norm EN71

化学物質に対する感受性が高い乳幼児が接する製品中の使用物質に関しては、特に安全性を喚起する必要がある。欧州では繊維製品の安全性自主基準として OEKOTEX Standard が用いられ、染料の溶出量も規定されている。特に乳幼児用製品の基準は厳しく定められている¹⁾。しかし、分析方法などは非公開である。ドイツでは、ドイツ規格及びドイツ日用品規制令(LMBG)において、アゾ染料・顔料などが規制され、分析方法など定められている。さらに中国でも、繊維製品に使用されるアゾ染料から生成する24種の芳香族ア

ミンについて国家的に規制されている。欧州では、EN71「玩具の安全性規制」の中で繊維製玩具に使用する染料に対して、16種の着色剤と9種の芳香族第一アミン類が規制されている^{2,3)}。この規格では初期試験方法から最終試験方法までの分析法も公開されている^{2,3)}。我々は、初回試験に該当するJISの汗に対する染色堅牢度試験(JIS L 0801:2004)⁴⁻⁶⁾に加えて人工唾液による溶出試験⁷⁾を既に実施した⁸⁾。EN規格では、初回試験で色落ちした製品(3級以下)には、最終試験分析法を実施する事になっている。そこで、まず我々は、9種の芳香族第一アミン類のGC/MSによる分析調査を行った⁹⁾。16種の着色剤の最終試験法では、まずフォトダイオードアレイ検出HPLC(HPLC-DAD)による定性及び半定量方法を行う事が記載されている。そこで今回、この分析法を検討した。さらに、市販乳幼児繊維製品(玩具、衣服)について分析調査を行った。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

^{*2} ジーエルサイエンス株式会社

^{*3} 国立医薬品食品衛生研究所

1. 試料

市販の乳幼児用衣服7製品（8部位）、繊維製玩具5製品（12部位）をHPLC測定用の試料とした（Table 1）。

Table 1. Analyzed commercially available products

No.	Usage	Materials	Manufacturer	Country
1	Coverall	Cotton 100%	Familiar	Japan
2	Trousers	Cotton 100%	BOBSON	China
3	Sweater	Cotton 70%, nylon 15%, wool 15%	BOBSON	China
4	Cut and sewn	Cotton 100%	VON AMMY	China
5	Cut and sewn	Cotton 100%	AEON	China
6	Trousers	Cotton 70%, nylon 90%, polyurethane 10%	AIC	China
7	Coverall	Polyester 100%, cotton 95%, polyurethane 5%	Takihyo	China
9	Toy			
10	(the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
11				
12	Toy			
13	(the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
14				
15	Toy			
16	(the stuffed toy)	Unknown	ORGANIC	China
17	Toy			
18	(the stuffed toy)	Polyester	TAKARA TOMY	China
19	Toy			
20	(clothes of the doll)	Polyester and others	TAKARA TOMY	China

2. 試薬

規制されている16種の着色剤標準品の製造社名及びCAS番号をTable 2に示す。各標準品5 mgを量り取り、エタノール100 mlに溶解した。この溶液を40℃で1時間超音波槽に入れて完全に溶解させ、50 µg/mlの標準原液を作製した。これを希釈して標準液系列を作成した。

アセトニトリル、エタノールは和光純薬製残留農薬試験用を用いた。精製水はミリポア製超純水製造装置（逆浸透膜後、イオン交換処理）Milli RO 5plus, Milli Q plusを通過した超純水を用いた。

Table 2. CAS number and Manufacturer of 16 kinds of colorants

	CAS No.	Manufacturer
C.I. Disperse Blue 1	2475-45-8	Aldrich
C.I. Disperse Blue 3	2475-46-9	Sigma-Aldrich
C.I. Disperse Blue 106	12223-01-7	FLUKA
C.I. Disperse Blue 124	61951-51-7	FLUKA
C.I. Disperse Yellow 3	2832-40-8	Sigma-Aldrich
C.I. Disperse Orange 3	730-40-5	Sigma-Aldrich
C.I. Disperse Orange 37	13301-61-6	FLUKA
C.I. Disperse Red 1	2872-52-8	Aldrich
C.I. Solvent Yellow 1	60-09-3	Aldrich
C.I. Solvent Yellow 2	60-11-7	Sigma-Aldrich
C.I. Solvent Yellow 3	97-56-3	Sigma-Aldrich
C.I. Basic Red 9	569-61-9	Sigma-Aldrich
C.I. Basic Violet 1	8004-87-3	Aldrich
C.I. Basic Violet 3	548-62-9	Sigma-Aldrich
C.I. Acid Red 26	3761-53-3	Sigma-Aldrich
C.I. Acid Violet 49	1694-09-3	TOKYO KASEI

3. HPLC装置及び分析条件

HPLC装置はGL Science社製GL-7400 HPLCシステム

を用いた。送液ポンプは、GL-7410、フォトダイオードアレイ検出器はGL-7452、カラム恒温槽はGL-7430、オートサンプラーはGL-7420、データ処理はEZChrom Elite ver3.3.7Jを用いた。HPLCカラムは、GL Science社製Inertsil ODS-SP（4.6 mm φ×250 mm、5 µm）を用いた。カラム恒温槽温度は40℃に設定した。移動相条件を以下に示す。A液はアセトニトリル、B液は10 mM NaH₂PO₄ と5 mM TPA (HClO₄でpH 2.8に調整) の混合水溶液の2液グラジュエントで行った（注：TPA；テトラプロピルアンモニウムヒドロキシドの10%水溶液）。A液とB液の混合比は、25/75-(45 min)-80/20-(0.1 min)-25/75(15 min. hold)となるグラジュエントプログラムで行った。流量は1.0 ml/min、注入量は10 µlで、ピークの同定は、リテンションタイム及びUVスペクトルで同定した。定量は、各物質に適した波長（Table 3）で定量した。

Table 3. The optical wavelength for measurement of each colorant

Colorants	Wavelength (nm)
Disperse Blue 1	615
Basic Red 9	543
Acid Red 26	518
Acid Violet 49	593
Solvent Yellow 1	382
Disperse Blue 106	614
Basic Violet 1	586
Disperse Yellow 3	357
Disperse Orange 3	436
Disperse Blue 3	641
Basic Violet 3	591
Disperse Red 1	496
Solvent Yellow 3	386
Disperse Blue 124	595
Solvent Yellow 2	415
Disperse Orange 37	430

4. 試験溶液の調製

試料（繊維製品）0.5 gを細切り、40 mlのガラスびんに量り採った。エタノール10 mlを加え、ガラスびんを超音波槽に入れ、15分間放置した。その抽出液を試験管に移し、アルゴン気流下で1 mlに濃縮し、試験溶液とした。

結果および考察

1. HPLC測定法の検討

EN71に記載されたHPLC条件では、11種の着色剤（mix 1）と5種の着色剤（mix 2）を分けて、ODSカラムで各々分析する事になっている。今回、同じ逆相系

カラムのInertsil ODS-SPを用いて、16種の着色剤を同時分析できる条件を検討した。その結果、実験方法に記載した条件で、一度の測定で16種の着色剤の相互分離が可能となった。また、グラジュエント条件も3液混合から、2液混合の条件へと改良した。Fig.1にこれら16種の着色剤の300 nmでのHPLCクロマトグラム(各50 µg/ml)を示す。また、これらクロマトグラムの再現性は全て良好であった。Acid Red 26、Disperse Blue 3、Basic Violet 1などは標準品でも、複数のピークが出現する。これらピークの吸光スペクトルは、類似のスペクトルを示した。Acid Red 26 (Fig. 2)、Disperse Blue 3 (Fig.3)、Basic Violet 1 (Fig.4) のHPLCクロマトグラムと典型的な吸光スペクトルを示す。そこで、これ

ら物質は、各々のピークごとに検量線を作成した。例えば、Disperse Blue 3は、3つの検量線を作成した。各々の物質に適した波長のピーク面積値での検量線(1~5 µg/ml)を作成したところ、いずれも R^2 が0.99以上の良好な直線性を示した。定量限界は1 µg/ml以下であった。ただ、Disperse Blue 1は3 µg/ml以下で直線性がなくなり、定量限界値も4 µg/ml程度であった。

欧州 (EN71) における各物質の規制限度値(action limit)は、10 µg/g (mg/kg)である。これは操作法に従って最終試料溶液を1 mlのエタノール溶液にした場合、5 µg/mlの濃度である。各標準物質の感度から考慮すれば、定性的には十分確認可能な感度と考えられる。

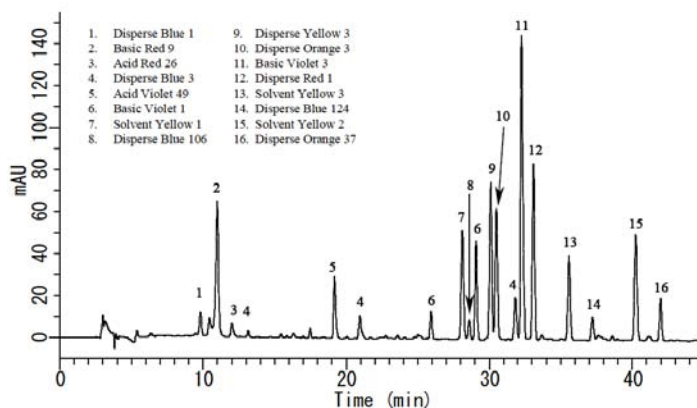


Fig.1. HPLC Chromatograms of 16 kinds of the coloring agents (300 nm)

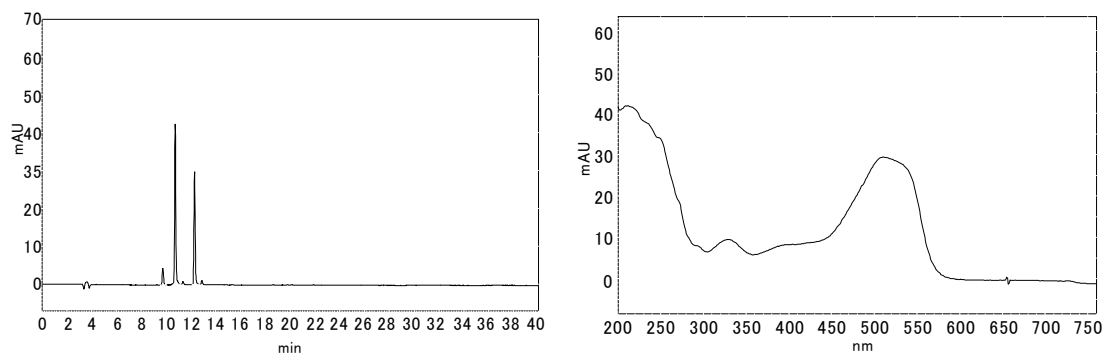


Fig.2. HPLC Chromatograms (510 nm) and absorption spectra (Rt. 12.29 min) of Acid Red 26

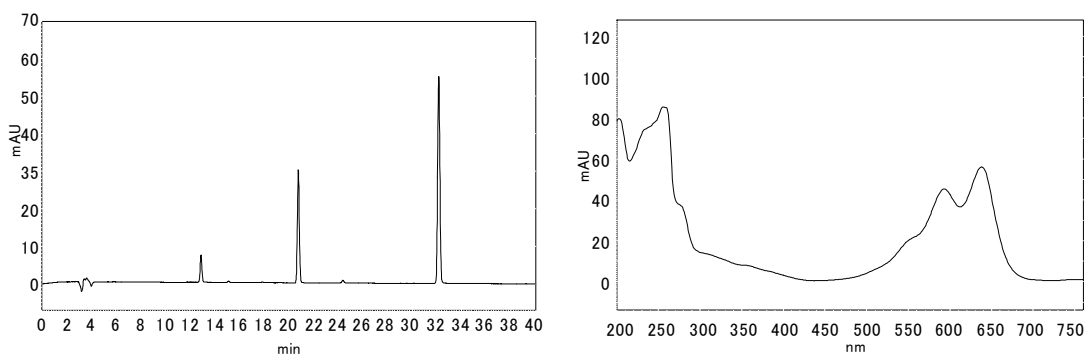


Fig.3. HPLC Chromatograms (640 nm) and absorption spectra (Rt. 32.15 min) of Disperse Blue 3

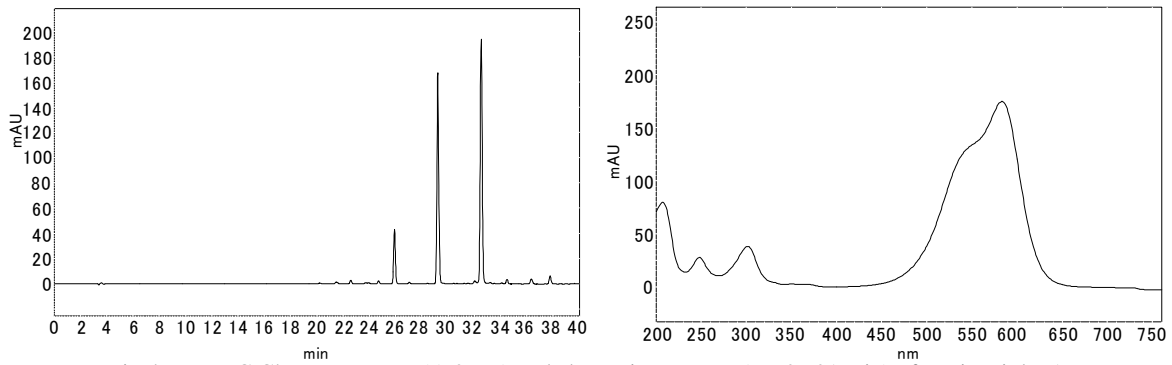


Fig.4. HPLC Chromatograms (590 nm) and absorption spectra (Rt. 29.21 min) of Basic Violet 1

2. 試験溶液調製法の検討

試料溶液の調製方法は、実験方法の項に記載したように、ほぼEN71の方法に準拠した。抽出エタノール溶液は、ガラスフィルターでろ過した。

3. 市販製品の分析

我々は既に市販の乳幼児用繊維製品41製品(62部位)と玩具8製品(15部位)に対し初期試験(染色堅牢度試験)に、人工唾液による溶出試験7も加えて実施し、基準違反(3級以上)製品はなかったものの、乳幼児用衣服7製品(8部位)から色落ちしたことを報告した⁸⁾。そこで、それらの7製品(8部位)と、新たに購入した玩具5製品(12部位)に対して、HPLC-DADによる定性、半定量試験を行った。その結果、分析した製品からは、どの着色剤も検出しなかった。初期試験で3~4級の色落ちがあった試料No.1のHPLCクロマトグラム(300nm)をFig.5に示す。Acid Red 26類似(一致率0.96)

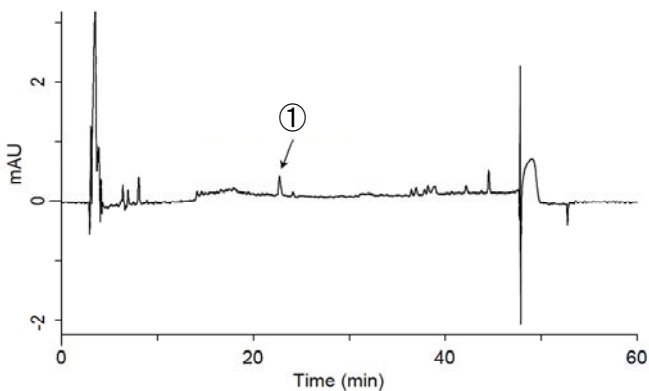


Fig.5. HPLC Chromatograms of Sample No.1

- ①The spectrum was similar to Acid Red 26 (The matching rate was 0.95).
The retention time was not corresponding.

のピークがあったが、リテンションタイムは不一致であった。反対に、リテンションタイムは一致するが、スペクトルが不一致の試料もあった。試料No.18のように両方のケースもあった(Fig.6)。しかし、ピークのリテンションタイムとスペクトル共に一致した試料はなかった。今後は、LC/MS/MSによる構造解析法を検討していく必要があると考えられ、その実験を行う予定である。

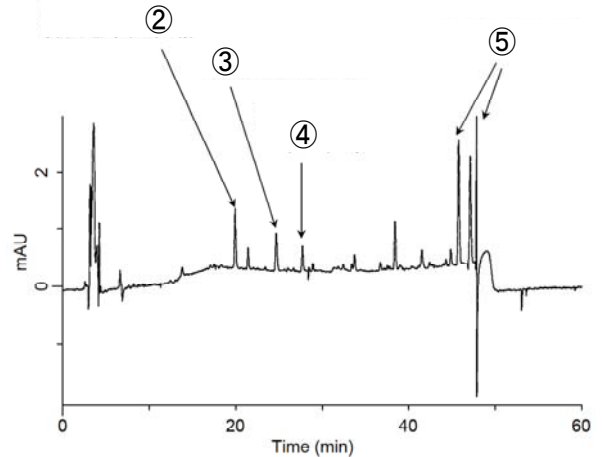


Fig.6. HPLC Chromatograms of Sample No.18

- ②The spectrum was similar to Solvent yellow (The matching rate was 0.76).
The retention time was not corresponding.
③The spectrum was similar to Basic Violet 1 (The matching rate was 0.75).
The retention time was not corresponding.
④The retention time was matched with Disperse Blue 106.
The spectrum was not corresponding.
⑤The spectrum was similar to Disperse Red 1 (The matching rate was 0.95).
The retention time was not corresponding.

まとめ

欧州規格EN71「玩具の安全性規制」の中で繊維製玩

具に使用規制されている16種の着色剤の最終分析法を検討した。この最終分析法では、まずフォトダイオードアレイ検出HPLC（HPLC-DAD）による定性及び半定量方法を行う事が記載されている。そこで今回、この分析法を検討して、方法の改良を行った。改良した方法で、市販の繊維製品（玩具、乳幼児用衣服）12製品（20部位）の分析を行った。その結果、全ての製品からこれら着色剤は検出しなかった。この方法でも定性分析は可能であるが、定量分析法として、LC/MS/MSによる構造解析法を検討していく必要があると考えられた。

本研究に用いた16種の着色剤標準品を提供して頂いた、（独）国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境曝露計測研究室 中島大介 主任研究員に深謝いたします。

文献

- 1) エコテックスについて、(財)日本染色検査協会 エコテックス事業所発行・編集, 東京 (2004)
- 2) 河村葉子, 高野忠夫, 津田 博:「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」, 平成 17 年度厚生労働科学研究分担研究報告書（食品の安心・安全確保推進研究事業）
- 3) 小瀬達夫, 岡田弘毅:平成 17 年度厚生労働科学研究「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」附属文書（欧州規格 EN 71-10 及び EN-11 最終原案）, pp160-208
- 4) (財)日本規格協会: 染色堅ろう度試験方法通則 JIS L 0801:2004, 東京 (2004)
- 5) (財)日本規格協会: 汗に対する染色堅ろう度試験法 JIS L 0848:2004, 東京 (2004)
- 6) (財)日本規格協会: 計器による変退色及び汚染の判定方法 JIS L 0809:2001, 東京 (2001)
- 7) (財)日本規格協会: 歯科用金属材料の腐食試験方法 JIS T 6002:2005, 東京 (2005)
- 8) 中島晴信, 高塚 正, 鹿庭正昭: 人工汗・唾液による乳幼児繊維製品（玩具及び衣類）からの染料成分の溶出挙動, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 46, 97-102 (2008)
- 9) 中島晴信, 鹿庭正昭: 乳幼児繊維製品（玩具及び衣

服）に使用されている染料成分中の芳香族第一アミン類の分析調査, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 47, 75-80 (2009)