

HPLCによる乳幼児用粘土から溶出する着色料の分析

(平成28年4月15日受理)

岸 映里* 尾崎麻子 大嶋智子 山野哲夫

HPLC Analysis of Colorants Migrated from Children's Modeling Clays

Eri KISHI*, Asako OZAKI, Tomoko OOSHIMA and Tetsuo YAMANO

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences:
8-34 Tojo-cho, Tennouji-ku, Osaka 543-0026, Japan;

*Corresponding author

A method using high-performance liquid chromatograph (HPLC) was developed for the identification of colorants migrated from colored modeling clays, which are popular toys for children. Twelve permitted dyes and 25 non-permitted dyes were analyzed in 20 clays (10 wheat clays, 2 rice clays, 2 corn clays, 3 paper clays and 3 resin clays). As a result, 13 products which were labeled for children's use (under 6 years old) met the specifications of the Japanese Food Sanitation Law, while non-permitted colorants were eluted from 2 products. In addition, unknown colorants were eluted from 3 products for people over 6 years old, although these are not covered by the Japanese regulation. It was suggested that some type of clays contained pigments, which are generally used in printing ink and plastics.

(Received April 15, 2016)

Key words: 玩具 toy; 粘土 clay; 着色料 colorant; 溶出 migration; 高速液体クロマトグラフ high-performance liquid chromatograph

緒 言

粘土あそびは幼い頃から楽しむことができ、創造力や集中力を養うことができるため、代表的な玩具の1つとなっている。色彩も豊富で、いろいろな素材からなる粘土が数多く市販されている。一方で、やわらかくて手に付着しやすいため、乳幼児が誤って口に入れてしまう可能性も高い。

わが国では、乳幼児（6歳未満）を対象とした玩具（指定玩具）は、乳幼児が接触することにより健康を損なうことがないように、食品衛生法に基づき規格および製造基準が設定されている。粘土については製造基準により着色料の使用が規制されており、粘土を40℃の水に10分間浸漬するとき、化学的合成品にあっては、食品衛生法施行規則別表第1掲載の22品目を除く着色料の溶出が認められてはならないと定められている。一方、欧州連合（EU）では、欧州規格EN71により14歳未満を対象とする粘土について、発がん性やアレルギー性のある分散青1（Disperse Blue 1）や分散黄3（Disperse Yellow 3）などの着色料16

種類、発がん性のあるベンジジンや2-ナフチルアミンなどの第一級芳香族アミン9種類、アレルギー性のある1,2-ベンジルイソチアゾリン-3-オンなどの防腐剤6種類のほか、カドミウムや鉛などの有害元素17種類が規制されている。また、米国の玩具の安全性に関する消費者安全規格ASTM F963および中国の国家標準規格GB6675では着色料の規制はなく、カドミウムや鉛などの有害元素8種類を規制している。このように玩具に関する規制は各国によって異なっているため、輸入品が指定外着色料の溶出によって食品衛生法違反となる例もある^{*1}。

最近では、乳幼児用の粘土として小麦粉を原材料とした小麦粘土だけでなく、小麦アレルギーを持つ乳幼児でも安心して遊べるように米粉やとうもろこし粉からなる粘土も販売されている。また、自然乾燥で固まる紙粘土や食品モデルの作成などに用いられる樹脂粘土など多様な製品が流通している。このような粘土については、プラスチックや紙、木製の玩具に比べて着色料の溶出が認められることが多いが、その着色料を調査した報告は極めて少ない¹⁾。そ

* 連絡先 e-kishi@city.osaka.lg.jp
大阪市立環境科学研究所: 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

*1 厚生労働省医薬食品局食品安全部 “平成23年度輸入食品監視指導計画に基づく監視指導結果” (平成24年9月) http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/kekka/dl/h23_zentai.pdf

ここで、さまざまな材質の粘土を対象に高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた着色料の試験法について検討した。食品衛生法では水に溶出する着色料が規制対象であるため、許可着色料は食品衛生法施行規則別表第1に掲載されている水溶性タール色素12種類を、指定外着色料は食品などで違反事例のある水溶性色素を中心に25種類を測定対象とした。また、確立した試験法を用いて粘土から溶出する着色料の実態調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

対象年齢6歳未満である指定玩具のほかに、乳幼児が遊ぶ可能性のある指定外玩具および手芸用材料の粘土も含めた20品目を対象とした。1色ずつ販売されている製品と複数の色の粘土を組み合わせ販売されている製品があったが、同一の種類と考えられる粘土は同じ品目とし、各色をそれぞれ別の検体とした。内訳は、小麦粘土10品目(68検体)、米粘土2品目(14検体)、とうもろこし粘土2品目(11検体)、紙粘土3品目(11検体)、樹脂粘土3品目(12検体)であった。

2. 標準品および試薬

許可着色料標準品 (Table 1): 東京化成工業(株)製の食品着色料検査試薬用対照試液Aセット(12種類)を用いた。

指定外着色料標準品 (Table 2): アゾルビン (AZR), レッド2G (R2G), ポンソー6R (P6R), グリーンS

(GS), ファーストレッドE (FRE), クロセインオレンジG (COG), アミドブラック10B (AB10B) およびブリリアントブラックBN (BBBN) は東京化成工業(株)製, キノリンイエロー (QY) およびパテントブルーV (PBV) はACROS ORGANICS社製, ローダミンB (RB) は関東化学(株)製, その他は東京化成工業(株)製の食品着色料検査試薬用対照試液Bセット(14種類)の計25種類を用いた。

着色料標準溶液: 各着色料の1,000 µg/mL水溶液を標準原液とし、これを適宜混合し、蒸留水で希釈して標準溶液とした。

0.05 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.0): リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (特級, 関東化学(株)製) 22.1 gとリン酸二水素ナトリウム (特級, 和光純薬工業(株)製) 52.6 gを蒸留水に溶かし1 Lとした。これを蒸留水で10倍希釈した。

アセトニトリル: 液体クロマトグラフィー用, 関東化学(株)製

エタノール: 残留農薬試験・PCB試験用, 関東化学(株)製

ろ紙: No. 5A, アドバンテック東洋(株)製

メンブランフィルター: DISMIC, 親水性PTFE, 0.45 µm, アドバンテック東洋(株)製

3. 装置および測定条件

3.1 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

装置: Waters社製Alliance e2695システム; 検出器:

Table 1. Permitted dyes measured by HPLC

Label	Permitted dye	Color index No.	Measurement wavelength (nm)
R2	Amaranth (Food Red No. 2)	16185	520
R3	Erythrosine (Food Red No. 3)	45430	520
R40	Allura Red AC (Food Red No. 40)	16035	520
R102	New Coccine (Food Red No. 102)	16255	520
R104	Phloxine (Food Red No. 104)	45410	520
R105	Rose Bengal (Food Red No. 105)	45440	520
R106	Acid Red (Food Red No. 106)	45100	520
Y4	Tartrazine (Food Yellow No. 4)	19140	450
Y5	Sunset Yellow FCF (Food Yellow No. 5)	15985	450
B1	Brilliant Blue FCF (Food Blue No. 1)	42090	620
B2	Indigo Carmine (Food Blue No. 2)	73015	620
G3	Fast Green FCF (Food Green No. 3)	42053	620

Table 2. Non-permitted dyes measured by HPLC

Label	Non-permitted dye	Color index No.	Measurement wavelength (nm)
AZR	Azo Rubine	14720	520
EOS	Eosine	45380	520
FRE	Fast Red E	16045	520
PR	Ponceau R	16150	520
P3R	Ponceau 3R	16155	520
P6R	Ponceau 6R	16290	520
PSX	Ponceau SX	14700	520
R2G	Red 2G	18050	520
RB	Rhodamine B	45170	520
COG	Crocein Orange G	15970	450
OI	Orange I	14600	450
OII	Orange II	15510	450
MY	Martius Yellow	10315	450
NYS	Naphthol Yellow S	10316	450
QY	Quinoline Yellow	47005	450
UN	Uranine	45350	450
ABVX	Azur Blue VX	42045	620
PBV	Patent Blue V	42051	620
BMG	Brilliant Milling Green	42100	620
GGB	Guinea Green B	42085	620
GS	Green S	44090	620
LGSFY	Light Green SF Yellowish	42095	620
AV6B	Acid Violet 6B	42640	620
AB10B	Amido Black 10B	20470	620
BBBN	Brilliant Black BN	28440	620

Waters社製2998フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器; カラム: ジーエルサイエンス(株)製Inertsil pH (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm); カラム温度: 40℃; 移動相: A液0.05 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.0), B液アセトニトリル; グラジエント条件: B液を0から50%まで50分間リニアグラジエントを行い, そのまま5分間保持した; 流量: 1.0 mL/min; 測定波長: 400~650 nm; 注入量: 20 μL

3.2 フーリエ変換赤外分光装置 (FT-IR)

装置: Thermo Fisher Scientific社製Nicolet iS10, 全反射測定 (ATR) ユニットSmart iTR (ダイヤモンドクリスタル) 付; 積算回数: 16回; 分解能: 4 cm⁻¹; 波数領域: 650~4,000 cm⁻¹

3.3 蛍光X線分析装置 (XRF)

装置: 日本電子(株)製JSX-3000 Element Analyzer; X線管: ロジウムターゲット; 管電圧: 50 kV; 管電流: 自動; スペクトル: Kα線; フィルタ: なし; 測定雰囲気: 真空; 測定時間: 120秒; X線照射径: 7 mm

4. 溶出試験

食品衛生法に準じて試験を行った。すなわち, 試料の表面積1 cm²当たり2 mLの蒸留水を浸出用液として40℃で10分間放置し, 得られた溶出液を試験溶液とした。試験溶液50 mLをネスラー管に採り, 上方および側方から観察し, 着色の有無を目視により確認した。

5. 確認試験

溶出試験で得られた試験溶液をろ紙でろ過し, 再度着色の有無を目視により確認したのち, メンブランフィルターでろ過したものをHPLCにより測定した (水測定溶液)。小麦およびとうもろこし粘土の場合はろ過に用いたろ紙およびメンブランフィルターを約4 mLのエタノールで洗浄し, 得られた洗液も測定した (エタノール測定溶液)。

6. 確認試験法の検討

許可着色料12種類および指定外着色料25種類の混合標準溶液を測定し, HPLC条件の確認を行った。

添加回収試験は, 白色粘土の試験溶液に混合標準溶液を各1 μg/mLとなるように添加後, 5. に従って2種類の測定溶液を調製し, HPLCによる検出の有無を確認した。

7. 指定外着色料の使用が疑われた粘土の組成分析

試料を乾燥させ水分を除去した後, FT-IRおよびXRFにより各種スペクトルを測定した。

結果および考察

1. 確認試験法の検討

食品衛生法では, 指定玩具を40℃の水に10分間浸漬するとき, 化学的合成品にあつては食品衛生法施行規則別表第1掲載品目を除く着色料の溶出が認められてはならないと定められている。着色料の溶出が目視で認められた場合

にはその着色料が許可着色料であることを確認する必要があるが^{*2}, 確認法については定められていない。食品の場合は水またはエタノール混液で抽出後, 羊毛やポリアミドにより精製したのち, 薄層クロマトグラフィーやHPLCを用いて着色料の同定を行う²⁾。HPLCでは高感度に多種類の着色料を検出できることから, 本研究でも溶出試験で得られた試験溶液をろ過した後, HPLCにより測定して着色料を確認した。

1.1 HPLC測定条件

測定対象とした許可着色料12種類および指定外着色料25種類の混合標準溶液 (各10 μg/mL) のクロマトグラムをFig. 1に示した。食用赤色102号 (R102) とBBBN (17.2 min), ポンソー3R (P3R) とオレンジI (OI) とエオシン (EOS) (28.7 min), オレンジII (OII) もしくはCOGとAB10B (34.5 min) はそれぞれ保持時間が近く十分な分離とはいえないが, それぞれが単独で検出された場合は吸収スペクトルを確認することで同定は可能であった。一方, ライトグリーンSF黄色 (LGSFY) と食用緑色3号 (G3) (29.8 min), OIIとCOG (34.4 min) は, それぞれ保持時間および吸収スペクトルがともに類似しており, 今回の測定条件では同定が難しいため, これらの着色料が検出された場合には, 測定条件などを変更して確認試験を行う必要があると考えられた^{3)~6)}。しかしながら, 今回はいずれの検体からもそれらの着色料の疑いがあるピークが検出されなかったため, 本測定条件で同定を行った。

なお, 本法による検出限界 (S/N≥3) は, LGSFYおよびギネアグリーンB (GGB) は0.2 μg/mL, P6R, 食用青色2号 (B2), AZR, 食用赤色3号 (R3), 食用赤色104号 (R104), 食用赤色105号 (R105) およびRBは0.1 μg/mL, その他の着色料は0.05 μg/mL以下であった。

1.2 測定溶液調製法の検討

1.2.1 溶出液のろ過操作の影響

HPLCで測定する際には, 溶出液中の不溶物が分析カラムなどに目詰まりし, 圧力の上昇や異常なクロマトグラムを示す原因となるため, あらかじめメンブランフィルターなどでろ過する必要がある。食品衛生法では確認試験法が示されていないため, 溶出液のろ過の有無などについても規定されていない。しかし, 粘土の溶出液中には粘土由来の微粒子が多量に分散しているため, ろ過の有無によって結果に差異が生じる可能性が考えられた。そこで, 異なる材質の白色粘土を用いて添加回収試験を行い, ろ過操作の影響について検討した。

小麦粘土1および2, 米粘土1, とうもろこし粘土1, 紙粘土2ならびに樹脂粘土2の白色の試験溶液に測定対象とした37種類の着色料を各1 μg/mLとなるように添加し, ろ紙およびメンブランフィルターでろ過した後, HPLCにより測定した。その結果, 米粘土1, 紙粘土2および樹脂粘土2では37種類すべての着色料が検出されたが, 小麦粘土1および2では, R3, R104, R105, AB10Bおよびアシッドバイオレット6B (AV6B) が検出されず, とうもろ

*2 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知 “おもちゃに係る改正に関するQ&Aについて (その3)” (平成20年8月12日), 食安基発第0812001号

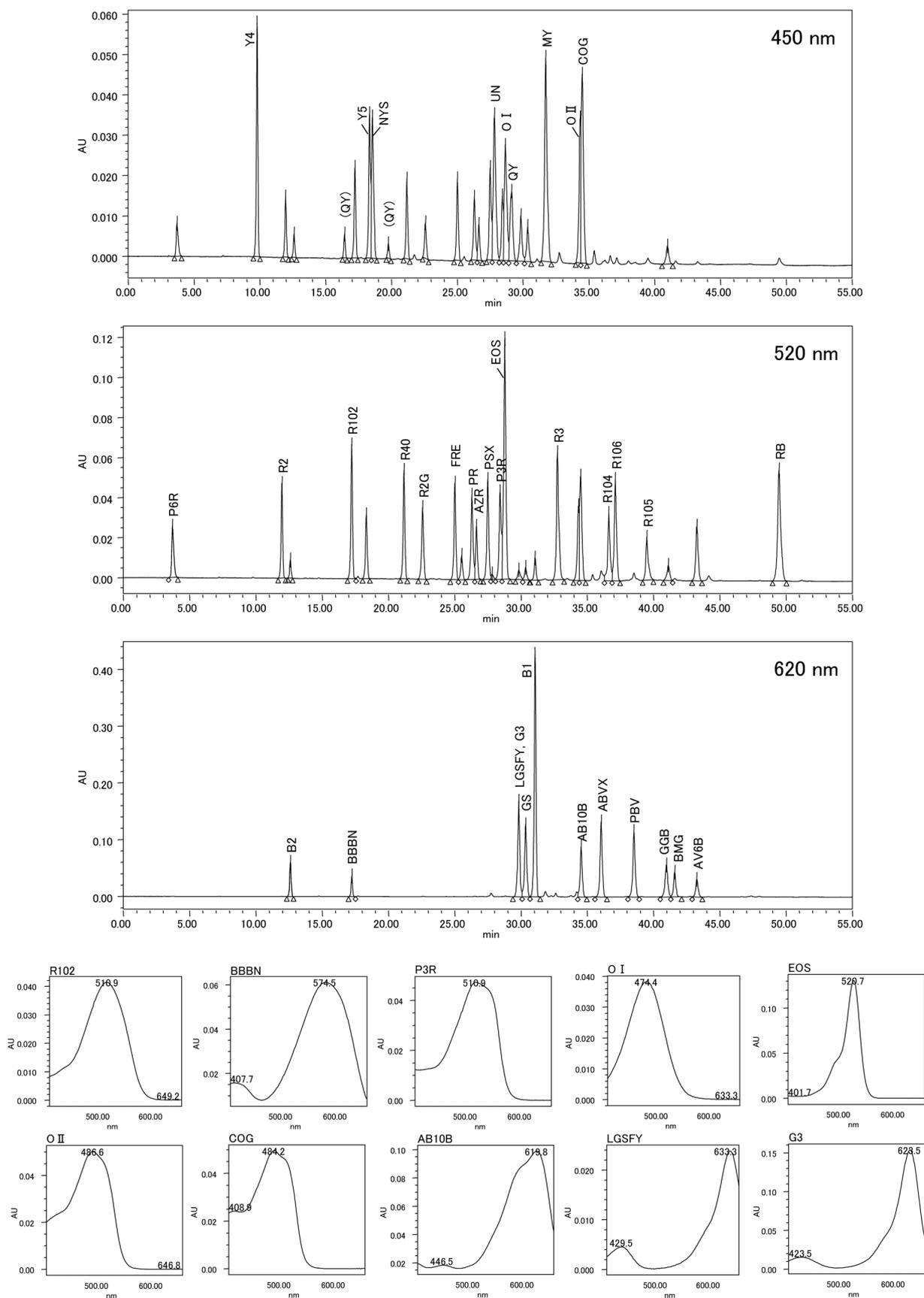


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard solutions of 37 dyes and representative PDA spectra (10 µg/mL)

Table 3. Results of recovery test

Sample	Qualitative analysis by HPLC						
	12 permitted dyes				25 non-permitted dyes		
	R3	R104	R105	Others	AB10B	AV6B	Others
Wheat clay 1	★	★	★	●	★	★	●
Wheat clay 2	★	★	★	●	★	★	●
Rice clay 1	●	●	●	●	●	●	●
Corn clay 1	●	●	★	●	●	●	●
Paper clay 2	●	●	●	●	●	●	●
Resin clay 2	●	●	●	●	●	●	●

Spiked concentration: 1 µg/mL

●: Detected in aqueous solution, ★: Detected in ethanol washing solution

こし粘土1においてもR105が検出されなかった (Table 3).

R3, R104およびR105はキサントン系の許可着色料であり, タンパク質に染色性を持ち, また, 酸性溶液中で析出するため, 食品中の着色料分析においては回収率が低下することが報告されている^{7),8)}. 今回は試験溶液を酸性にすることなく測定していることから, これらの着色料は試験溶液中に分散している小麦およびとうもろこし粘土の粒子に吸着し, ろ紙およびメンブランフィルターに保持されたと推測された. AB10BおよびAV6Bも同様にタンパク質に染色性を持つため⁹⁾, ろ紙およびメンブランフィルターに保持されたと推測された.

小麦およびとうもろこし粘土では, ろ過により検出されない着色料があることが判明した. しかし, 溶出液に含まれている着色料は乳幼児が摂取する可能性がある. また, R3, R104およびR105は許可着色料であるため, これらが溶出液に含まれており目視で着色が認められてもHPLCで確認できない場合, 指定外着色料の溶出として違反の誤判定をするおそれもある. そのため, 溶出したすべての着色料を確認できる試験法の確立が望ましいと考えられた.

1.2.2 エタノール洗液の測定

R3, R104およびR105は水よりもエタノールに溶けやすいことから²⁾, 溶出液のろ過に使用したろ紙およびメンブランフィルターをエタノールで洗浄し, その洗液を測定することで, ろ過により検出できなかった着色料の検出を試みた.

あらかじめエタノールによるクロマトグラムへの影響を確認するため, エタノールで調製した着色料標準溶液を測定した. その結果, 保持時間が9~22 minの食用黄色4号(Y4), 食用赤色2号(R2), B2, R102, BBBN, 食用黄色5号(Y5), ナフトールエローS(NYS)および食用赤色40号(R40)ではピーク割れが見られたが, エタノール洗液による測定対象であるR3, R104, R105, AB10BおよびAV6Bを含むその他の着色料では影響は見られなかったため, エタノール洗液をそのままHPLCに導入して測定することにした.

次に, 1.2.1の添加回収試験において小麦粘土1および2, とうもろこし粘土1の試験溶液のろ過に用いたろ紙およびメンブランフィルターをエタノールで洗浄し, 得られた洗液をHPLCで測定した. その結果, 小麦粘土1および2ではR3, R104, R105, AB10BおよびAV6Bが検出され, とうもろこし粘土1ではR105が検出された (Table 3).

以上より, HPLCによる着色料の確認試験では, すべての材質の粘土について試験溶液をろ過して測定し, 小麦およびとうもろこし粘土についてはエタノール洗液の測定を追加することで, 測定対象とした37種類の着色料の確認が可能な試験法を確立した.

2. 粘土の実態調査

粘土20品目(116検体)について溶出試験を行った. 着色料の溶出の有無を目視で確認し, 溶出が認められた検体についてはHPLCによる確認試験を行った. 結果をTable 4に, 代表的なHPLCクロマトグラムをFig. 2に示した. 白色の検体ではいずれも着色料の溶出は認められなかった. 有色の検体については, 材質ごとに以下に述べる.

2.1 小麦, 米およびとうもろこし粘土

小麦粘土10品目中9品目は指定玩具であり, 小麦粘土10のみ対象年齢6歳以上と明記されていたが, パッケージの絵柄は乳幼児用の検体と類似しており, 乳幼児が玩具として遊ぶ可能性が考えられた. 米およびとうもろこし粘土はすべて指定玩具であった.

小麦および米粘土では白色を除く71検体すべてで試験溶液の着色が認められた. そのうち小麦粘土2のマゼンタ, 小麦粘土3の紫色, 小麦粘土5の桃色と紫色の計4検体はろ過により試験溶液の色が無色透明に変化した. 一方, とうもろこし粘土では11検体すべてで試験溶液に着色は認められなかった.

着色料の溶出が認められた小麦および米粘土についてHPLCにより水測定溶液を測定した. 赤・橙色検体からは許可着色料のR102, R2, Y4およびY5が単独もしくは組み合わせで検出された. 桃色検体からは赤色検体と同様にR102およびY5が検出されたほか, R40が検出された.

Table 4. Results of migration test

Sample	Color	Indication ¹⁾		Visual checking ²⁾		Qualitative analysis by HPLC ³⁾										25 non-permitted dyes		
		Country	Age	Before filtration	After filtration	R2	R3	R40	R102	R106	Y4	Y5	B1	B2	Others			
Wheat clay 1	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	●	●	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
Brown	+	+	×	×	●	×	×	×	×	●	●	●	×	×	×	×		
Wheat clay 2	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Magenta			+	-	-	★	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Blue	+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×		
Wheat clay 3	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Pink			+	+	×	★	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Orange			+	+	×	×	×	●	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	●	×	●	×	×	×
	Yellowish green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Purple			+	-	-	★	-	-	-	-	-	-	×	●	-	-	-
	Brown			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	●	●	×	×	×
	Black			+	+	●	×	×	×	×	×	×	●	●	●	×	×	×
Wheat clay 4	Red	China	≧3 years	+	+	×	×	×	●	×	×	●	×	×	×	×		
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
Wheat clay 5	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	★	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	
	Pink			+	-	-	★	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Orange			+	+	×	★	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	●	×	●	×	×	×
	Purple			+	-	-	★	-	-	-	-	-	-	★	-	-	-	-
Wheat clay 6	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Pink			+	+	×	×	×	●	×	×	×	●	×	×	×	×	
	Orange			+	+	×	×	×	●	×	×	●	●	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Yellowish green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
Brown	+	+	×	×	×	●	×	×	●	●	●	×	×	×				
Wheat clay 7	White	Japan	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	●	×	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	●	×	×	●	×	×	×	
Wheat clay 8	White	China	≧2 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Pink			+	+	-	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Orange			+	+	×	×	×	×	×	×	●	●	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Yellowish green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
Violet	+	+	×	★	★	×	×	×	×	×	×	●	×	×				
Wheat clay 9	White	China	≧3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Magenta			+	+	●	★	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	
Blue	+	+	×	×	×	×	×	×	×	●	●	×	×	×	×			
Wheat clay 10	White	China	≧6 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red			+	+	●	×	×	●	×	×	●	●	×	×	×	×	
	Pink			+	+	●	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Orange			+	+	×	×	×	×	×	×	×	●	●	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Yellowish green			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Violet			+	+	●	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	
	Brown			+	+	×	×	●	×	×	×	●	●	●	×	×	×	
Black	+	+	●	×	×	×	×	×	●	●	●	×	×	×				

1) —: No indication

2) +: Positive, -: Negative

3) ●: Detected in aqueous solution, ★: Detected in ethanol washing solution, ×: Not detected, —: Not measured

Table 4. Continued

Sample	Color	Indication ¹⁾		Visual checking ²⁾		Qualitative analysis by HPLC ³⁾										25 non-permitted dyes		
		Country	Age	Before filtration	After filtration	12 permitted dyes												
						R2	R3	R40	R102	R106	Y4	Y5	B1	B2	Others			
Rice clay 1	White	China	≥3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Pink			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×
	Green			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	●	×	×	×	×
Rice clay 2	White	China	≥3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Pink			+	+	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Orange			+	+	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×	×	×	×
	Light blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	●	×	×	×
	Yellowish green			+	+	×	×	×	×	×	×	●	×	●	×	×	×	×
	Brown			+	+	×	×	×	●	×	●	×	●	×	●	×	×	×
Corn clay 1	White	Japan	≥3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Yellow			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blue			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Green			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corn clay 2	White	Holland	≥4 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Yellow			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blue			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Yellowish green			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paper clay 1	Red	Japan	≥3 years	+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Paper clay 2	White	Japan	≥3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red		-	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Yellow		-	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Blue		-	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
Paper clay 3	White	Japan	≥6 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Resin clay 1	White	Japan	≥3 years	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Yellow			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Blue			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Resin clay 2	White	Japan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Resin clay 3	White	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Red			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Yellow			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	Blue			+	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		

1) -: No indication
 2) +: Positive, -: Negative
 3) ●: Detected in aqueous solution, ★: Detected in ethanol washing solution, ×: Not detected, -: Not measured

黄色検体からはY4, 青・水色検体からは食用青色1号 (B1), 緑・黄緑色検体からはY4およびB1が検出された. 紫色検体からはB1, B2およびR2が単独もしくは組み合わせで検出された. 茶・黒色検体からはR2, R40, R102, Y4, Y5およびB1が組み合わせで検出された. ただし, 小麦粘土10の黒色では保持時間33.6 minに測定対象とした37種類の着色料とは保持時間と吸収スペクトルが合致しないピークが見られた (Fig. 2 (D)). B1の標準溶液でもわずかながら同様のピークがみられ (図示せず), B1には不純物として付随色素などが存在することが報告されていることから¹⁰⁾, B1由来のピークと推測された.

その他の検体では測定対象外の着色料の存在を示すピークは確認されず, すべての検体から測定対象とした25種類の指定外着色料はいずれも検出されなかった. R102, Y4, Y5およびB1の検出頻度が高く, これらが小麦および米粘土に多用されていることが分かった.

次に, エタノール測定溶液では小麦粘土2のマゼンタ, 小麦粘土3の桃・紫色, 小麦粘土5の赤・桃・橙・紫色, 小麦粘土8の紫色, 小麦粘土9のマゼンタの計9検体からR3が検出された. ろ過により試験溶液が無色透明になった4検体や色調が変化した検体が含まれており, ろ過により水測定溶液では検出されなかったR3がエタノールで溶

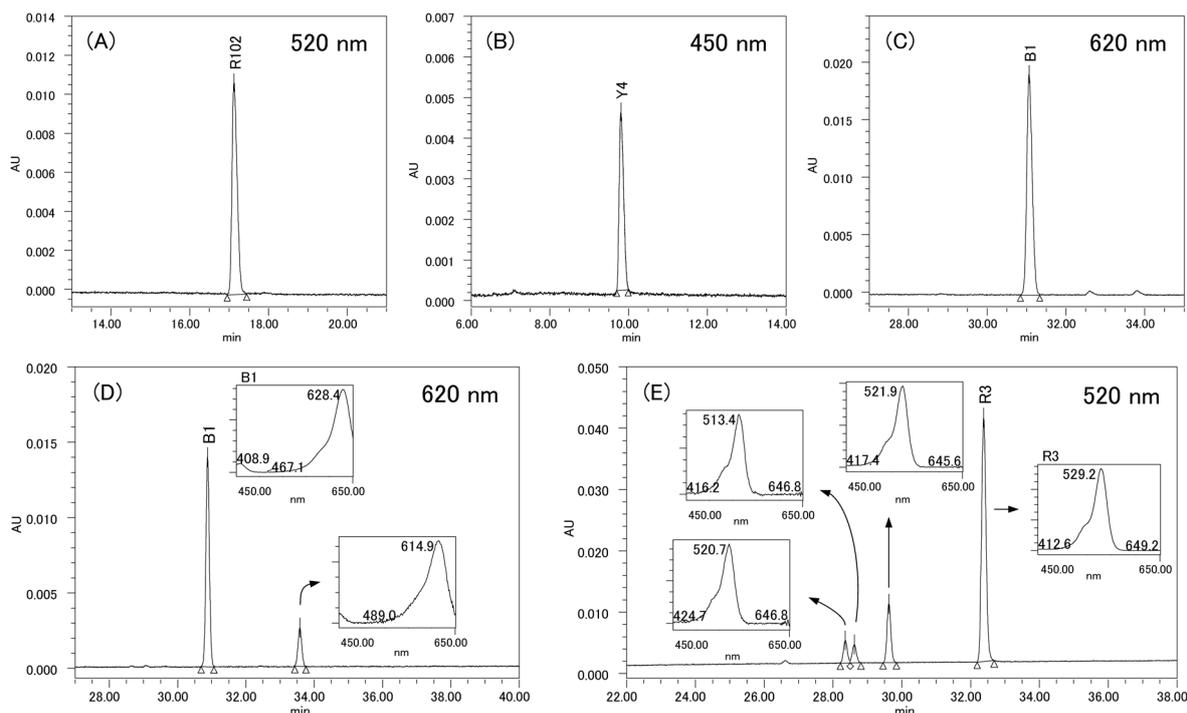


Fig. 2. HPLC chromatograms of representative samples

(A) Wheat clay 3 (Red)— aqueous solution (B) Wheat clay 3 (Yellow)— aqueous solution (C) Wheat clay 3 (Blue)— aqueous solution (D) Wheat clay 10 (Black)— aqueous solution (E) Wheat clay 2 (Magenta)— ethanol washing solution.

出したと考えられた。また、小麦粘土5の紫色からはB1が、小麦粘土8の紫色からはR40が検出された。これらは試験溶液にごく微量含有されており、エタノール測定溶液は水測定溶液より濃いため検出されたと考えられた。その他にR3が検出された9検体については、測定対象の着色料とは保持時間と吸収スペクトルが合致しないピークが数本みられたが (Fig. 2 (E)), 市販品のR3には付随色素などの不純物が含まれていることが報告されていることから¹¹⁾, R3由来のピークと推測された。

以上より、小麦および米粘土については溶出した着色料は許可着色料であり、とうもろこし粘土については着色料の溶出は認められず、すべて製造基準に適合していることが確認された。

2.2 紙および樹脂粘土

紙粘土1は指定玩具であった。紙粘土2は白色のみ対象年齢3歳以上と明記され、有色の粘土には対象年齢が記載されていなかった。しかしながら、両者のパッケージはよく似ており、有色の粘土についても明らかに乳幼児用と考えられたことから指定玩具と判断された^{*3}。紙粘土3は6歳以上と明記された指定外玩具であったが、パッケージは乳幼児用のものと類似しており、乳幼児が遊ぶ可能性が考えられた。樹脂粘土3品目はいずれも手芸用材料であり樹脂粘土1のみ対象年齢3歳以上と記載されていた。

紙粘土では白色を除く9検体すべてで、樹脂粘土では9検体中6検体 (67%) で試験溶液の着色が認められた。着色が認められなかった樹脂粘土1は酢酸ビニル樹脂を主体とした粘土であり、着色が認められたその他の検体は主に合成樹脂製の中空の微小球体 (微小中空球樹脂) や繊維粉からなる軽量粘土であった。

着色料の溶出が認められた紙および樹脂粘土15検体についてHPLCにより水測定溶液を測定したところ、すべての検体で測定対象とした許可着色料12種類および指定外着色料25種類はいずれも検出されなかった。クロマトグラムにその他の着色料の存在を示すピークも確認されず、今回の条件では測定できない指定外着色料の使用が推測された。

今回、測定対象とした12種類の許可着色料以外に、食品衛生法施行規則別表第1に掲載されている許可着色料には、二酸化チタン、三酸化鉄、鉄クロロフィリンナトリウム、銅クロロフィリンナトリウム、銅クロロフィル、 β -カロテン、 β -アポ-8'-カロテナル、リボフラビン、ノルビキシナリウムおよびノルビキシナトリウムがある。二酸化チタン、三酸化鉄、銅クロロフィル、 β -カロテンおよび β -アポ-8'-カロテナルは水に不溶であり、リボフラビンは水に溶けにくく、光に不安定であるため¹²⁾、試験溶液の着色に関与している可能性は低いと推測された。鉄クロロフィリンナトリウム、銅クロロフィリンナトリウム、ノルビキシナリウムおよびノルビキシナトリウムは水に溶解し、HPLCで測定した400~650 nmの間に吸

*3 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「指定おもちゃの範囲等に関するQ&Aについて」(平成21年9月14日)、食安基発第0914第2号

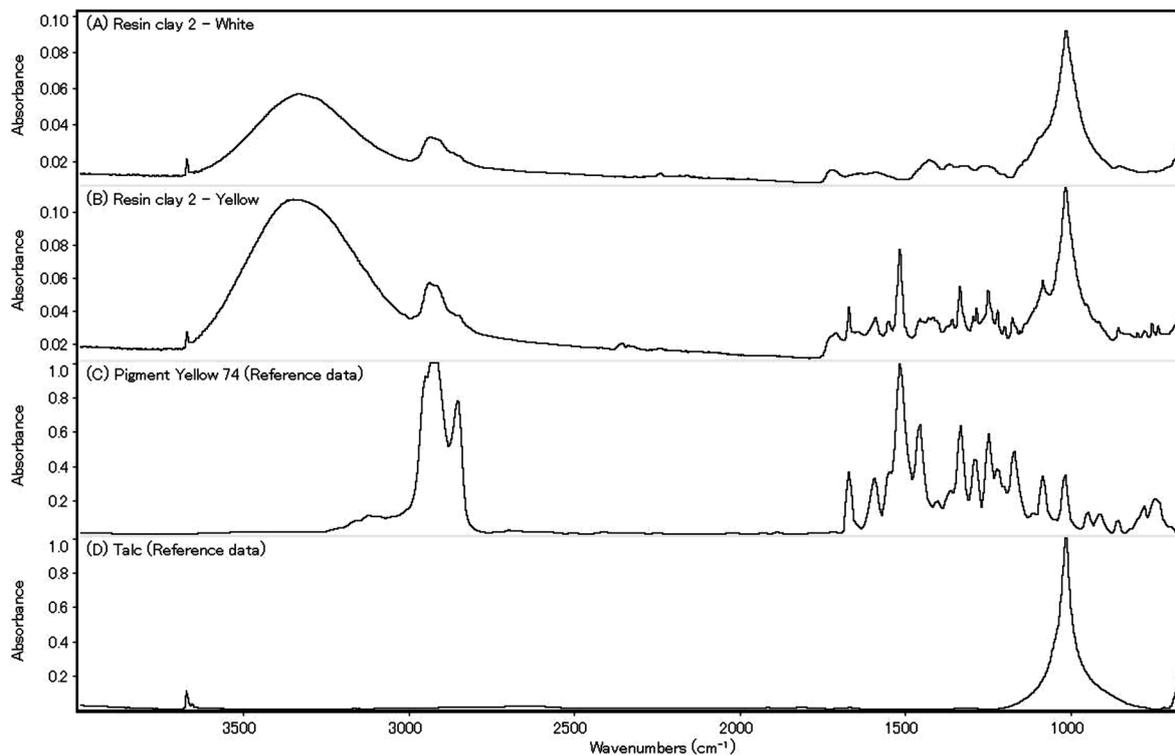


Fig. 3. IR spectra of resin clay 2

収を持つため、試験溶液に含まれていた場合はクロマトグラム上にピークが検出されると推測された^{13),14)}。また、同様に天然着色料においてもHPLCによる分析法が報告されており¹⁵⁾、試験溶液に含まれていた場合はピークが検出されると推測された。以上より、これらの着色料が試験溶液に含まれている可能性は低いと考えられた。

指定玩具もしくは乳幼児が遊ぶ可能性のある指定外玩具である紙粘土3品目は指定外着色料溶出の疑いがあった。樹脂粘土1は手芸用材料であったが、食品衛生法の製造基準に適合していた。樹脂粘土2および3もパッケージは樹脂粘土1と同様の手芸用材料であり、乳幼児が玩具とする可能性は低いと考えられるが、これらの検体からは測定対象としなかった着色料の溶出が示唆された。

3. 指定外着色料の使用が疑われた粘土について

溶出試験の結果、紙粘土1~3および樹脂粘土2~3において食品衛生法施行規則別表第1掲載品目以外の着色料の溶出が示唆されたが、今回測定対象とした指定外着色料は検出されなかった。

すべての検体の原材料表示を比較したところ、約半数の検体で着色料の使用が明記されており、小麦、米およびとうもろこし粘土には「色素」、紙および樹脂粘土には「顔料」と記載されていた。顔料は水や有機溶媒などに不溶あるいは難溶で、バインダーと呼ばれる接着剤用樹脂などと混合され、物体中に分散させて着色させることを基本とする色素である¹⁶⁾。着色に用いられる顔料は無機顔料と有機顔料に大別され、無機顔料にはチタン、亜鉛、鉛、クロム、鉄、コバルト、カドミウム、銅などの金属化合物があ

り、有機顔料にはアゾ系顔料、フタロシアニン系顔料、縮合多環系顔料がある。顔料の分析にはFT-IRによる化学構造の同定やXRFにより金属元素の検出する手法が用いられる¹⁷⁾。そこで、指定外着色料の溶出が疑われた粘土についてFT-IRおよびXRF分析を行った。

FT-IR分析の結果、樹脂粘土2の黄色粘土には1,100~1,700 cm⁻¹付近に他の色の粘土と異なる吸収ピークが見られた。白色粘土との差スペクトルを求め、650~2,000 cm⁻¹の領域でライブラリ検索を行ったところ、印刷インキや文具、プラスチックに用いられるアゾ顔料であるピグメントイエロー74とよく一致し（一致率83%）、含有されている可能性が示唆された（Fig. 3）。1,000 cm⁻¹付近の吸収ピークはどの色の粘土でも見られ、粘土の充填剤などとして含有されているタルクに由来するものと考えられた。これ以外の検体については着色料に起因する吸収ピークは見られず、樹脂粘土3はタルクに、紙粘土1は炭酸カルシウムやケイ酸塩に由来する赤外スペクトルが得られた。紙粘土2および3は主材である微小中空球樹脂のバインダーとして含有されるポリビニルアルコールに由来するスペクトルが得られ、紙粘土3については炭酸カルシウムの含有も推測された。

XRFによる元素分析結果をTable 5に示した。青色の検体すべてから銅が検出され、青色粘土については青色顔料として代表的なピグメントブルー15（銅フタロシアニン）が使用されていることが推測された。ほかの色の検体では検出元素に特徴は見られなかった。ケイ素やカルシウムは検体の色とは関係なく検出され、充填剤などとして配合さ

Table 5. Elements in samples detected by X-ray fluorescence spectrometry

Sample	Color	Element							
		Si	S	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Br
Paper clay 1	Red	++	-	++	+	+++	+	-	-
	Yellow	++	-	++	+	+++	+	-	-
	Blue	++	-	++	+	+++	+	+	-
Paper clay 2	White	-	+	+++	-	-	-	-	-
	Red	-	++	+++	-	-	-	-	-
	Yellow	-	+	+++	-	-	-	-	-
	Blue	-	+	+++	-	-	-	+	-
Paper clay 3	White	-	+	+++	-	+++	-	-	-
	Red	-	+	+++	-	+++	-	-	-
	Yellow	-	+	+++	-	+++	-	-	-
	Blue	-	+	+++	-	+++	-	+	-
Resin clay 2	White	++	-	++	-	+	+	-	+
	Red	++	+	++	-	+	+	-	-
	Yellow	++	+	++	-	+	-	-	-
	Blue	++	-	++	-	+	+	++	-
Resin clay 3	White	++	-	-	-	+	+	-	+
	Red	++	+	-	-	+	+	-	+
	Yellow	++	+	-	-	+	+	-	+
	Blue	++	+	-	-	+	+	++	+

Integrated intensity +++: $\geq 100,000$, ++: $10,000 \sim 100,000$, +: $1,000 \sim 10,000$, -: $< 1,000$

れている無機粉体（タルク，炭酸カルシウム，シラスバルーンなど）に，塩素は塩化ビニリデン-アクリロニトリル共重合体からなる微小中空球樹脂などに由来するものと推測された．また，いずれの検体からも鉛，クロム，カドミウムなどの有害元素は検出されず，人体への悪影響が懸念されている有害な無機顔料が使用されている可能性は低いと考えられた．

指定玩具である紙粘土1および2の有色の検体について，おもちゃのQ&A^{*2}に従い製造・販売業者に使用した着色料を確認したところ，紙粘土1の赤および黄色は捺染用の顔料を，青色は印刷インキやプラスチック，捺染に用いられる顔料（ピグメントブルー15）を使用していることが判明し，青色顔料については銅が検出されたXRFの結果と一致していた．紙粘土2についても指定外着色料の使用が確認され，これらの製品は食品衛生法違反として回収された．

今回，指定外着色料の使用が疑われた粘土についてFT-IRおよびXRFを用いて同定を試みた結果，一部の粘土で使用着色料が推測できたが，その他の多くの粘土では同定に至らなかった．一般的に無機顔料は化学組成や結晶構造がはっきりしているものが多く比較的的同定しやすいが，有機顔料は非常に多くの種類があるため同定は困難である．赤や黄色顔料の同定には，顔料を粘土成分や充填剤などの他成分と分離する必要があると考えられたが，粘土中の顔料はごく微量であるため，分離および同定は困難であった．指定外着色料の溶出が疑われた場合には製造者または輸入者から使用着色料の情報を得ることが重要と考えられた．

ま と め

代表的な乳幼児用玩具の1つである粘土について，着色料の試験法を検討し，小麦粘土10品目，米粘土2品目，とうもろこし粘土2品目，紙粘土3品目および樹脂粘土3品目の計20品目を対象に実態調査を行った．

1) 試験法の検討を行った結果，米，紙および樹脂粘土は溶出液をろ過してHPLCで測定することで測定対象とした許可着色料12種類および指定外着色料25種類すべてが検出可能であった．小麦およびとうもろこし粘土についてはろ過により検出されない着色料があったため，エタノール洗液の測定を追加し，すべての着色料の確認を可能とした．これより，粘土溶出液中に含まれる37種類の着色料の確認試験法を確立した．

2) 6歳未満の乳幼児を対象とした小麦粘土9品目，米粘土2品目およびとうもろこし粘土2品目は食品衛生法に適合していることが確認されたが，紙粘土2品目からは指定外着色料の溶出が認められた．

3) 対象年齢3歳以上と記載されていた手芸用材料の樹脂粘土1品目は着色料の溶出が認められず，食品衛生法に適合していた．

4) 対象年齢6歳以上の小麦粘土1品目は食品衛生法に適合していることが確認されたが，対象年齢6歳以上の紙粘土1品目および手芸用材料の樹脂粘土2品目から指定外着色料の溶出が示唆された．そのうち小麦および紙粘土についてはパッケージの絵柄が乳幼児用のものと類似しており，指定玩具かどうかは対象年齢表示のみでなく，パッケージなどから総合的に判断する必要があると考えられた．

5) 指定外着色料としてピグメントイエロー74やピグメントブルー15といった顔料の使用が推測された。

文 献

- 1) 大城紀子. 玩具の衛生化学調査. 沖縄県公害衛生研究所報, **11**, 79-80 (1977).
- 2) 日本薬学会編. “衛生試験法・注解2015”. 東京, 金原出版, 2015, p. 380-388. (ISBN 978-4-307-47043-8)
- 3) Miyatake, N., Nagayama, T. Simultaneous analytical method of synthetic colours in food using TLC and HPLC. Tokyo Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health), **56**, 145-151 (2005).
- 4) Miyakawa, H., Horii, S., Igusa, K., Sasamoto, T., Miyazaki, T., Kokubo, Y. Confirmation of Orange II detected from dried shrimps. Tokyotoritsu Eisei Kenkyusyo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **47**, 75-77 (1996).
- 5) Ueno, E., Nakashima, H., Takakura, K., Okazaki, K., Nagai, H., Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Ishikawa, N. Identification of non-permitted dye Orange II used in a pickled vegetable. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **37**, 226-230 (1996).
- 6) Uematsu, Y., Hirokado, M., Nakajima, K., Takahashi, I., Matsui, K., Kazama, M. High performance liquid chromatographic determination of impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF (II) Determination of subsidiary colors. Tokyotoritsu Eisei Kenkyusyo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **39**, 151-155 (1988).
- 7) Yamagami, T., Yazaki, A. Extraction method of food coal-tar dyes in foods for high performance liquid chromatography. Yamanashiken Eisei Kankyo Kenkyusyo Nenpo (Annual Report of the Yamanashi Institute for Public Health and Environment), **55**, 42-44 (2011).
- 8) Hayashi, K., Chiba, Y., Yanagi, S., Yamaguchi, Y., Ujiie, A., Hamana, T. Studies on extraction and clean-up for food coal-tar dyes. Miyagiken Hoken Kankyo Senta Nenpo (Annual Report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment), **27**, 97-99 (2009).
- 9) Nakabayashi, T., Okabe, K., Mochizuki, A. Studies on the dyeing capacity of food-color-stuff on food. Part IV: Dyeing capacity to wheat gluten. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi (Japanese Society for Food Science and Technology), **12**, 457-461 (1965).
- 10) Kamikura, M. Structures of subsidiary colors in Food Blue No. 1 and their separation and determination by high performance liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan.), **27**, 27-36 (1986).
- 11) Ito, Y., Suzuki, H., Ogawa, S., Iwaida, M. Detection and determination of starting materials and uncombined intermediates of organic synthesis as well as subsidiary dyes remained in cosmetic coal-tar dyes by high performance liquid chromatography (II). Nihon Kesyuhin Gijutsusya Kaishi (J. Soc. Cosmet. Chem. Japan), **16**, 105-118 (1983).
- 12) 谷村顕雄監修. “第8版食品添加物公定書解説書”. 東京, 廣川書店, 2007, 2500p. (ISBN 978-4-567-01853-1)
- 13) Yasuda, K., Tadano, K., Ushiyama, H., Ogawa, H., Kawai, Y., Nishima, T. Investigation to find an indicator substance for the analysis of sodium copper chlorophyllin in foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **36**, 710-716 (1995).
- 14) Oka, H., Ito, Y., Goto, T., Matsumoto, H. An HPLC method for the determination of water-soluble annatto in food. Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Japanese Journal of Food Chemistry), **11**, 155-157 (2004).
- 15) Nakajima, K., Hirokado, M., Shimamura, Y., Ozawa, H., Kimura, K., Yasuda, K. Analysis of natural colours in commercial food by high-performance liquid chromatography. Tokyotoritsu Eisei Kenkyusyo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **51**, 85-90 (2000).
- 16) 伊藤征司郎. 顔料総論. 色材協会誌, **83**, 308-316 (2010).
- 17) 坪内健治郎. 色材における分析. 色材協会誌, **67**, 92-102 (1994).