

Ⅱ. 人工唾液による、おもちゃに含まれるフタル酸ジイソノニル(DINP)

の溶出条件の検討

1- まえがき

前報 I においてフタル酸エステルの GC, GC-MS および HPLC それぞれの分析法の設定をし、本分析法を用いて、おもちゃ 18 種の PVC 製部品に含まれるフタル酸エステルの種類とその含有量について報告した。

本報 II では、フタル酸エステルの DINP が高濃度で含有していて、乳幼児が口腔内に入れるおもちゃとして、「おしゃぶり (DINP 含有量 58.3%)」を用いて、人工唾液による DINP の溶出条件について種々検討した。

2- 実験方法

試薬・器具

本実験に用いた試薬・器具はすべて前報 I に準じた。

人工唾液； 塩化ナトリウム 4.5g, 塩化カリウム 3.0g, 無水硫酸ナトリウム 0.3g, 塩化アンモニウム 0.4g, 乳酸 3.0g および尿素 0.2g をそれぞれ蒸留水 1L に溶かしたものを人工唾液として用いた。

装置

振とう回数可変装置付上下振とう機：RECIPRO SHAKER, SR-IIW, タイテック社製
振とう回数可変装置付左右振とう培養器：UNI THERMOSHAKE, NTS-2000, EYELA 社製

その他、本実験で使用した装置は前報 I に準じた。

試験片の作製

試験品おもちゃのポリ塩化ビニル製「おしゃぶり (DINP 含有量 58.3%)」を表面積が

15cm² となるように縦 3cm, 横 2.5cm に切片したものを試験片とした。

人工唾液による DINP の溶出試験

試験片 (表面積 15cm²) 1cm² あたり、溶出溶媒 2mL となるように、本実験での溶出溶媒量は人工唾液 30mL とした

1) 上下振とう及び左右振とうによる溶出：

試験片をネジ蓋付 50mL 容遠心分離管、または共栓付 100mL 容三角フラスコにとり、人工唾液を 30mL 加えた後、蓋または共栓をし、15 分間ずつの振とう溶出を第 1 区分とし、合計 4 区分 (60 分間) の溶出試験を行なった。第 1 区分ごとに溶出溶媒を適量採取し、新しく溶出溶媒の人工唾液 30mL を加えて第 2 区分の振とう溶出を行なった。同様に 3, 4 区分の振とう溶出を行なった。

2) ビー玉添加による振とう溶出：

上下振とう溶出におけるビー玉添加試験では、上記した 1) のネジ蓋付 50mL 容遠心分離管に、試験片を入れた後、同分離管に必要な数のビー玉を添加し、以下同様に調製した。

また左右振とう溶出試験の場合はネジ蓋付 50mL 容遠心分離管に、上記と同様に調製したものを振とうしても遠心分離管内の溶出溶媒がほとんど動かず、この試験は不可であることが分かったので、遠心分離管のかわりに、共栓付 100mL 容三角フラスコを用いた。

DINP の測定

得られたそれぞれの溶出液 5mL にアセトニトリル 5mL を加え、激しく振とうし、これを HPLC 分析用試験液とした。それぞれ区分の溶出溶媒中の DINP 量を前報 I に準じて HPLC 分析を行なった。

3- 実験結果および考察

上下振とうによる DINP の溶出

上下振とうの振とう回数を 250 回/分、300 回/分とそれぞれ変化させ、15 分間ずつ 4 回それぞれの振とう回数で DINP の溶出を検討した。その結果を表 II-1 に示した。振とう回数 250 回/分と 300 回/分それぞれの 60 分間での DINP の総溶出量はそれぞれ 56.1 μ g と 1588 μ g で、振とう回数 300 回/分の溶出量は、250 回/分のそれぞれ 28 倍量であった。また溶出時間(15 分間の区分間)の DINP 溶出量は、第 1 区分および第 2 区分、第 3 区分、第 4 区分とも同様の結果であった。

一方、振とう回数 250 回/分と 300 回/分それぞれの区分間 DINP 溶出量の減少率は、第 1 区分と第 4 区分とを比較すると、250 回/分の場合約 30%、300 回/分で約 10%であり、振とう回数 300 回/分が DINP を一定に溶出することが明らかになった。

つぎに、振とう時間の変化とともに DINP の溶出量が減少する傾向が見られたことから、振とう回数 300 回/分で、振とう時間を 15 分間ずつ 12 回、計 180 分の DINP 溶出量の変化を検討した。その結果を図 II-1 に示した。振とう時間が長くなるにつれ DINP 溶

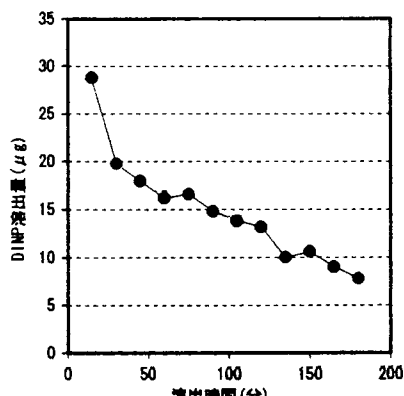


図 II-1 上下振とうによる PVC 製品からの DINP 溶出量の経時変化
試験品：おしゃぶり (DINP 含有量 58.3%)
●-●-● DINP 溶出量 (μ g)

表 II-1 DINP の上下振とう溶出に及ぼす

振とう回数の影響

区分	振とう時間(分)	DINP 溶出量 (μ g)	
		振とう回数 250回/分	300回/分
1	0 - 15	15.3 [0.5]	400 [13.3]
2	15 - 30	17.1 [0.6]	440 [14.7]
3	30 - 45	13.2 [0.4]	397 [13.3]
4	45 - 60	10.5 [0.4]	351 [11.7]
総DINP溶出量		56.1 [0.5]	1588 [13.3]

DINP；フタル酸ジイソニル

[] 内；唾液 mL あたりの DINP 溶出量 (μ g/mL)

振とう条件；上下振とう、振幅 40mm、室温(18°C)

溶出溶媒；人工唾液 30mL/1区分

試験品；おしゃぶり (DINP 含有量 58.3%)

出量は減少し、165~180 分間での溶出量は最初の 15 分間の約 25% 量であった。

左右振とうによる DINP の溶出

振とう培養器の振幅は 40mm で、振とう回数を 1 分間に 80 回、100 回、120 回および 160 回と変化させ、振とう時間を 15 分間ずつを 1 区分、2 区分、3 区分および 4 区分とし、DINP の溶出量を測定した。その結果を表 II-2 に示した。振とう回数が 80、100、120 回/分および 160 回/分それぞれの DINP 総溶出量はそれぞれ 175 μ g、153 μ g、720 μ g および 1840 μ g であった。80 回/分、100 回/分それぞれの総溶出量に大きな差は見られなかったが、120 回/分のそれと大きな差が現れた。また、160 回/分とではさらに大きな差となった。各振とう区分の DINP 溶出量をそれぞれ比較すると、80 回/分、100 回/分には区分間において大きなバラツキがあ

表Ⅱ-2 DINPの左右振とう溶出に及ぼす振とう回数の影響

		DINP溶出量 (μg)			
区分	振とう時間(分)	振とう回数 80回/分	100回/分	120回/分	160回/分
1	0 - 15	102 (3.4)	107 (3.6)	207 (8.9)	521 (17.4)
2	15 - 30	40.4 (1.3)	14.4 (0.5)	257 (8.6)	453 (15.1)
3	30 - 45	21.9 (0.7)	15.1 (0.5)	137 (4.6)	440 (14.7)
4	45 - 60	10.7 (0.4)	17.6 (0.6)	119 (4.0)	426 (14.2)
総DINP溶出量		175 (1.5)	153 (1.3)	720 (6.0)	1840 (15.3)

DINP: フタル酸ジイソノニル

[] 内: 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)

振とう条件: 左右振とう, 振幅 40mm, 37°C

溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分

試験品: おしやぶりのDINP含有量58.3%

った。120回/分では若干の差がでたが、160回/分では問題となるバラツキは見られなくなった。

また、振とう回数160回/分でのDINP溶出量は各区分および総溶出量それぞれにおいて、上下振とうの300回/分溶出量にほぼ近い値であった。

ビー玉添加によるDINP溶出の補助効果

上下振とうおよび左右振とうそれぞれの

表Ⅱ-3 DINPの上下振とう溶出に及ぼすビー玉添加の影響

		DINP溶出量 (μg)				
区分	振とう時間(分)	ビー玉数 対象 (コ)	2	6	10	12
1	0 - 15	400 (13.3)	243 (8.1)	237 (7.9)	93.1 (3.1)	64.5 (2.2)
2	15 - 30	440 (14.7)	183 (6.1)	210 (7.0)	69.1 (2.3)	70.2 (2.3)
3	30 - 45	397 (13.2)	171 (5.7)	234 (7.8)	74.8 (2.5)	70.2 (2.3)
4	45 - 60	351 (11.7)	152 (5.1)	224 (7.5)	80.8 (2.7)	68.5 (2.3)
総DINP溶出量		1588 (13.2)	749 (6.2)	905 (7.5)	318 (2.6)	273 (2.3)

DINP: フタル酸ジイソノニル

[] 内: 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)

振とう条件: 左右振とう, 振幅 40mm, 振とう回数 300回/分, 室温(18°C)

溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分

試験品: おしやぶりのDINP含有量58.3%

溶出時にビー玉を添加し、DINPの溶出が振とう時間で一定の溶出量が得られるかどうかを検討した。その結果を表Ⅱ-3と表Ⅱ-4に示した。上下振とう溶出は振とう回数300回/分、左右振とう溶出は振とう回数120回/分、振幅を40mmとした。

上下振とう溶出の場合、DINPの総溶出量はビー玉添加なしが1588μg、2コ添加で749μg、6コで905μg、10コで318μg、12コの場合273μgであった。上下振とう溶出にビー玉を添加することにより、DINP総溶出量は添加なしの場合と比べ減少した。特に、ビー玉の数が12コするとき極端に減少した。これは、試験片が溶出溶媒中でほとんど動かなかつたためと考えられる。

左右振とう溶出でのDINP溶出量に対するビー玉の添加の影響を、ビー玉添加なしあるいは3コ添加し、溶出用容器(底面の大きさ)を変化させ、振とう回数120回/分、37°Cで検討した。その結果、溶出用容器の大きさによってDINPの溶出量に影響がでた。底面が平底で大きさ6cmの100mL容の三角フラスコに、ビー玉を3コ加え溶出を行なったとき、

表Ⅱ-4 DINPの左右振とう溶出に及ぼすビー玉添加の影響

		DINP溶出量 (μg)				
区分	振とう時間(分)	容器底面の型	直径6cmの平底 (100mL三角フラスコ)		直径7cmの平底 (200mL三角フラスコ)	
		ビー玉数	無	有	無	有
1	0 - 15		207 (6.9)	115 (3.8)	261 (8.7)	434 (14.5)
2	15 - 30		256 (8.5)	139 (4.6)	252 (8.4)	365 (12.2)
3	30 - 45		137 (4.6)	128 (4.3)	125 (4.2)	296 (9.9)
4	45 - 60		119 (4.0)	114 (3.8)	153 (5.1)	278 (9.3)
総DINP溶出量			719 (6.0)	496 (4.1)	791 (6.6)	1373 (11.4)

DINP: フタル酸ジイソノニル

[] 内: 唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)

振とう条件: 振幅 40mm, 振とう回数 120回/分の左右振とう, 37°C

ビー玉の数 無-0個 有-3個

溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1区分

試験品: おしやぶりのDINP含有量58.3%

ビー玉無しの対象に比べて DINP 溶出量は約 35%の減少であった。一方、200mL 容三角フラスコでは、底面が平底で 7.5cm であり、ビー玉添加と添加しない対象を比べた場合、DINP 総溶出量は 791 μg と 1391 μg であり、ビー玉を添加することにより溶出量は約 75%増加した。これは試験片と溶出溶媒が効率よく接触するためと考えられる。

以上の結果より、上下振とう溶出にビー玉を添加したとき、ビー玉の数が多くなるほど溶出量が減少し、ビー玉を全く添加しない上下振とう溶出が、今回検討した溶出実験中で最大の溶出量となった。一方、ビー玉を 3 コ添加し振とう回数 120 回/分で左右振とうを行なうことで、人工唾液による DINP 溶出量は、各溶出時間(各区分間)でほぼ一定の値となり、60 分間を通して安定した溶出傾向となることが明らかとなった。

人工唾液による PVC 製おもちゃのフタル酸エステル溶出量

前報 I でフタル酸エステルの含有が確認された PVC 製のおもちゃの試験品のなかで、DBP, DEHP, DEHA, DINP をそれぞれ単独もしくは数種類含む試験品「がらがら-A」顔面部、「歯がため」歯がため部、「おしゃぶり」おしゃぶり部、「ボール-A」黄色部および桃色部、「ボール-B」青色部および赤色部、「ボール-D」黄色透明部、「キッチンセット」目玉焼き部、「ままごとセット」食べ物-2 部の合計 8 種、10 部品を選択し、人工唾液による上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれにおけるフタル酸エステル溶出量に、試験品間またはエステルの種類間によって違いが生じるかどうかを検討した。

上下振とう溶出と、ビー玉を加えた左右振とう溶出それぞれの溶出条件は、振とう回

表Ⅱ-5-1 上下振とうによるポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステル類の溶出量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル (μg)				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
がらがら A	顔面	PVC	-	-	-	-	1498
歯がため	歯がため	PVC	-	-	-	-	1267
おしゃぶり	おしゃぶり	PVC	-	-	-	-	1583
ボール A	黄色部	PVC	626	762	N. D.	-	-
	桃色部	PVC	534	714	N. D.	-	-
ボール B	青色部	PVC	729	694	N. D.	-	-
	赤色部	PVC	656	735	N. D.	-	-
ボール D	黄色透明部	PVC	840	759	-	-	-
キッチンセット	目玉焼き	PVC	-	-	-	-	462
ままごとセット	食べ物 (2)	PVC	-	130	-	-	-

溶出条件：溶出面積 \times 2mlの人工唾液量で1時間(15 \times 4分間)溶出

振とう条件：上下振とう 300回/分

N. D. : 4 μg

材質の略語

PVC：ポリ塩化ビニル

フタル酸エステルの略語

DBP：フタル酸ジブチル

DEHP：フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

DEHA：アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)

DNP：フタル酸ジ-n-ノニル

DINP：フタル酸ジイソノニル

表II-5-2 左右振とうによるポリ塩化ビニル製おもちゃのフタル酸エステル類の溶出量

試験品	部品名	材質	フタル酸エステル (μg)				
			DBP	DEHP	DEHA	DNP	DINP
がらがら A	鏡面	PVC	-	-	-	-	309
歯がけため	歯がけため	PVC	-	-	-	-	223
おしゃぶり	おしゃぶり	PVC	-	-	-	-	697
ボール A	黄色部	PVC	262	N. D.	N. D.	-	-
	桃色部	PVC	278	219	N. D.	-	-
ボール B	青色部	PVC	282	260	N. D.	-	-
	赤色部	PVC	220	208	N. D.	-	-
ボール D	黄色透明部	PVC	241	149	-	-	-
キッチンセット	目玉焼き	PVC	-	-	-	-	N. D.
ままごとセット	食べ物 (2)	PVC	-	N. D.	-	-	-

溶出条件；溶出面積 \times 2mlの人工唾液量で1時間(15 \times 4分間)溶出，ビー玉3コ添加
振とう条件；左右振とう，振幅40mm，120回/分

N. D. ; 4 μg

材質の略語

PVC；ポリ塩化ビニル

フタル酸エステルの略語

DBP；フタル酸ジブチル

DEHP；フタル酸ジ2-エチルヘキシル

DEHA；アジピン酸ジ2-エチルヘキシル

DNP；フタル酸ジノニル

数 300 回/分と 120 回/分とし，溶出時間(振とう時間)を 60 分間とした．その結果を表 II -5 に示した．

今回使用した PVC 製おもちゃの試験品について，上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれで得られたフタル酸エステルは，各試験品ごとの材質試験によって確認されたものと一致した．またその溶出量は，左右振とう溶出より上下振とう溶出が 2~5 倍多かった．試験品(材質中)に含有するフタル酸エステルが 1%前後の場合，上下振とう溶出と左右振とう溶出それぞれからの溶出量が検出限界以下(4 μg 以下)という結果は，フタル酸エステルの物理化学的性質あるいは，PVC 製おもちゃそれぞれの表面構造や表面コーティングなどの影響と考えられた．

以上より人工唾液による上下振とうと左右振とうそれぞれの溶出法によるフタル酸エステル溶出量に差が見られた．しかし，各

試験品の材質中含有量と比較すると，そのエステル溶出率には大きな差が見られなかった．

これらの結果から，溶出法それぞれについては III 報での『ヒト口腔内での唾液への移行溶出試験の検討』から，その移行溶出量に近い溶出試験法の設定の基となると考えられる．

4. まとめ

DINP を高濃度含有し，乳幼児が口にに入れる目的で作られた PVC 製のおしゃぶり「おしゃぶり(DINP 含有 58.3%)」を用い，人工唾液による溶出条件について種々の検討を行ない，以下のような結果が得られた．

1) 上下振とう溶出により，溶出時間(15 分間の区分)ごとの DINP 溶出量は，振とう回数 250 回/分，300 回/分ともに，ほぼ一定であった．60 分間の総溶出量は 56.1 μg および

1588 μg であった。

2) 15分間の区分溶出を12回、合計180分間の上下振とうを行なったところ、165~180分間の溶出量は、最初の15分間の溶出量と比較して約75%減少した。

3) 振幅40mmの左右振とうによる60分間のDINP総溶出量は振とう回数80, 100, 120および160回/分で175 μg , 153 μg , 720 μg および1840 μg であった。また、溶出時間ごとの溶出量は120回/分で若干バラツキが見られ、160回/分で安定した。

4) 振とう溶出におけるビー玉の添加効果を検討したところ、上下振とうにおいて、ビー玉の添加数を増すほど溶出量が減少した。また、振幅40mmの左右振とう溶出にビー玉を3コ添加し、120回/分での溶出を行なったところ、ビー玉の添加なしでの溶出と比較して、バラツキなく安定した溶出量が得られた。

以上より、人工唾液による上下振とうおよび左右振とうそれぞれのDINP溶出量に差がみられたが、これをふまえ、第Ⅲ報での『ヒト唾液への溶出-移行実験』での条件設定につながると考えられる。