

紙に含まれる蛍光増白剤の定量方法に関する検討^{1*}

(東京大学大学院農学生命科学研究科) 加地麻衣子、江前敏晴、磯貝明

A study on quantitative determination of fluorescent brightening agent contained in paper

Maiko Kaji, Toshiharu Enomae and Akira Isogai
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

ABSTRACT

It is prohibited under the Food Sanitation Law to add fluorescent brightening agent (FBA) to paperboard for food packaging. However, a certain amount of FBA inevitably comes to be mixed in paperboard produced mainly from recycled pulp. For adequate decomposition or removal, quantitative determination of FBA was investigated. Logarithm of the fluorescence intensity measured by fluorescence spectrophotometer was almost proportional to the logarithm of the concentration in the range between 10 ppb and 10 ppm. Filter paper was dyed at pH 3 with FBA extracted at pH 9 from a recycled pulp. Fluorescence images of the dyed filter paper were acquired with a CCD camera. The logarithmic gray level of the images and the logarithmic concentration of the FBA solutions showed a linear relationship. With regard to FBA removal, although alkaline treatment up to pH 13.0 did not remove much of it, hypochlorite at 1 ppm was found to lower fluorescence intensity from 1000 ppb to approximately 1ppb as a corresponding FBA concentration. In the method of extracting FBA with superfluid CO₂ followed by quantitative determination by high performance liquid chromatography, FBA was extracted almost completely in the alkaline condition in which water and organic base were added to superfluid CO₂ as modifiers.

KEY WORDS

Fluorescence spectrophotometer, food packaging, hypochlorite, stilbene, superfluid CO₂

1. 緒言

紙は従来から包装容器材料として使用されているが、リサイクルが可能で生分解性を持つという特性を考えれば、従来にも増して紙が包装用途に広く使用されるようになる予測される。包装容器用の板紙の製造には大量の古紙パルプが使用されているが、その古紙の素性や流通経路は一般には不明であり、人体に有害な物質が混入する危険性がある。食品と板紙を直接接触させる使い方は稀であるが、小売店や消費者が不用意に接触させることは十分考慮に入れなくてはならない。また食料

^{1*} 本研究の一部は、平成 16 年度第 71 回紙パルプ研究発表会において発表した。

品の輸入量（重量）が増えつつあり、財務省の統計によると、第 20 類（野菜、果実、ナットその他植物の部分の調製品）は 1998 年から 2006 年の 8 年間で 43 % 増加しており、第 21 類（その他調製品）では 62 % 増加している。原産国で、食料品が有害な物質を含有するかもしれないような板紙と接触させた状態で出荷される可能性も高い。BSE や鳥インフルエンザなど食の安全や食の科学が非常に重要視される中、紙器といえどもやはり安全性の確保は必要である。蛍光増白剤は人体に有害ではないというデータが提示されている¹⁾ものの、化学構造が有害なジアミノスチルベンに似ており、依然として発ガン性の疑いを完全に否定することは難しい。いずれにしろ合成品である以上、食品に付着・溶出することは健康を害する危険を否定できない。このような意味合いから古紙処理プロセスの中で、蛍光増白剤の除去や分解が必要となる場合があっても簡単に処理する方法は今のところなく、将来的には簡便な除去・分解の制御方法を見出すことが望まれる。

食品衛生法では容器に蛍光染料等入れることを禁止している。そのような物質が微量である場合は測定そのものが困難であるため規制は難しいが、蛍光増白剤の場合は溶液濃度が 10 ppb 程度でも紫外線の照射による蛍光発光を目視で確認できるため、規制対象となりやすい面がある。しかし、食品衛生法で規定されている検査方法は、紙から蛍光増白剤をアルカリ抽出し、酸性下でガーゼに染着させ、紫外線照射により目視で有無を判断するという方法で、定量性に乏しく、行き過ぎた規制になりがちである。製紙業界では古紙の利用率を上げることが、業界を挙げての目標に掲げている。蛍光増白剤が多く含まれる印刷用紙から製造された古紙パルプが板紙の原料となるのはごく普通のことであり、行き過ぎた規制を行えば、紙のリサイクルシステムを根底から覆すことになる。宮川²⁾や直原³⁾らはこの問題に取り組み、適正な検査方法を検討した。その結果、食品を直接触れないように紙にポリオレフィンフィルムを貼って使用するなどした場合は、規制の対象外とすることなど海外では既に実施されている基準が日本の食品衛生法にも盛り込まれるに至った。2004 年 1 月に厚生労働省医薬食品局食品安全部から出された「蛍光物質を使用した器具又は容器包装の検査法について」と題する通達では、食品に直接接触しないような衛生上問題がない部分は試験の対象としないことや、蛍光が明確に判定しにくい場合には蛍光染料が使用されたことを事業者等に確認することなど、検査法の運用基準を明示する内容となっている。その他、ガーゼに抽出した蛍光染料を染着させる際の pH を 3~3.5 の狭い範囲に限定し、また蛍光を目視で判定するための参照用の写真を参考事例として掲げるなど試験の分析精度を高くしている。いずれも検査法の客観性を高めたことになる上、製紙業界にとっても非常に有利な内容と言える。

しかし検査法の客観性を高めたとはいえ、蛍光増白剤の有害性をいずれは再検討する必要がある可能性があること、参照用の写真が示す蛍光と同程度の蛍光の強さを判定するには依然曖昧さ残ることを考えると、蛍光増白剤含有量の客観的な定量方法を確立する必要がある。実用的な定量法としては、簡易的な分光蛍光光度計が考案されている。パルプを 0.5 % 程度の濃度に懸濁させた紙料の水面上に青色

発光ダイオードを利用して紫外線～波長 465 nm 領域の光を照射し、波長 515 nm 以上の光量を検出する半導体蛍光光度計を試作し、蛍光増白剤濃度 0～2500 ppb の範囲では、その濃度と蛍光強度との間に高い相関を示した⁴⁾。

本研究では、その他のいくつかの定量方法を検討した。

2. 実験

2.1. 蛍光増白剤試料

紙パルプ用途として日本で広く使用されているスチルベン骨格をもつ蛍光増白剤である Kayaphor NV liquid (日本化薬カラーズ製) を試料として用いた。このスチルベン系蛍光増白剤は図 1 に示す構造をもち、中央の二重結合部分がトランス体又はシス体の構造をとるが、蛍光性があるのはトランス体のみであり、温度や紫外線の照射によって容易にトランスからシスへの変換がおこる。これはシス型に移行することによって立体的な障害を生じると、スチルベン中の 2 つのベンゼン環が同一平面上に存在できなくなり、その結果セルロースに対する親和性が低下すること、シス型になると染料の吸収スペクトルが変化して蛍光発光に必要な 350nm 付近の光を吸収しなくなるので、増白能力が低下することなどによると考えられている⁵⁾。また、構造式の X,Y にスルホン酸基がつく数によりジ体、テトラ体、ヘキサ体となるが、実際にはおよそ 3:6:1 の混合物となっている。蛍光増白剤溶液を試料とするときは、原液は固形分濃度 27%であったが、この濃度 1 とし、脱塩水で希釈しその体積分率を ppm 又は ppb 単位で表示することとした。

2.2. 紙試料

2.2.1. 標準染着ろ紙試料

希塩酸で pH3 に調整した 2.1 の蛍光増白剤水溶液試料各 100 mL を 60 °C に保ち、20 mm×50 mm に採取したろ紙 (アドバンテック製定性分析用 2 種) をこれに 30 分間浸漬して蛍光増白剤を染着させた後、風乾した。

2.2.2. パルプ試料と蛍光増白剤抽出方法

上質系古紙パルプ (三菱製紙製) を用いた。古紙由来のものに加え新たに添加されたと思われる蛍光増白剤を含んでいる。染着時の pH が蛍光増白剤の定量に与える影響を検討するために上記パルプ試料 2.0 g (絶乾相当) を 60 °C、pH9 の希アンモニア水 100 mL で 10 分間蛍光増白剤を抽出した。金網でろ過したあとのろ液を、希塩酸を使って pH1.7～5.0 の範囲に調整し、これに上記と同じ寸法のろ紙を室温で 30 分間浸漬し、抽出した蛍光増白剤をろ紙に染着させた。

2.2.3. 蛍光増白剤除去条件の検討

蛍光増白剤を除去する方法として高濃度アルカリ処理と次亜塩素酸酸化処理を検討した。次亜塩素酸酸化処理については、蛍光を消去する方法として既に知られている^{6, 7)}。高濃度アルカリ処理では濃度 3 % の古紙パルプ懸濁液 80 mL に、水酸化ナトリウム水溶液を加えて容量が 100 mL で pH がそれぞれ 11.5 及び 13.0 となるように調整した。これを 60 °C に保ち 20 分間静置した。pH6.8 の脱塩水でも同様に処理

し、対照とした。ろ過によりパルプの回収と十分な洗浄を行い、手抄きによりパルプシートを調製した。さらにこのパルプシートから pH9 で蛍光増白剤を抽出し、pH3 でろ紙に染着させた。

次亜塩素酸酸化処理ではパルプ懸濁液 80 mL に、次亜塩素酸ナトリウム濃度がそれぞれ 0、25、50、100、1000ppb となるように添加した。この処理及び抄紙・抽出/染着の条件は、前述と同様とした。

以上の染着ろ紙は蛍光画像撮影に供した。

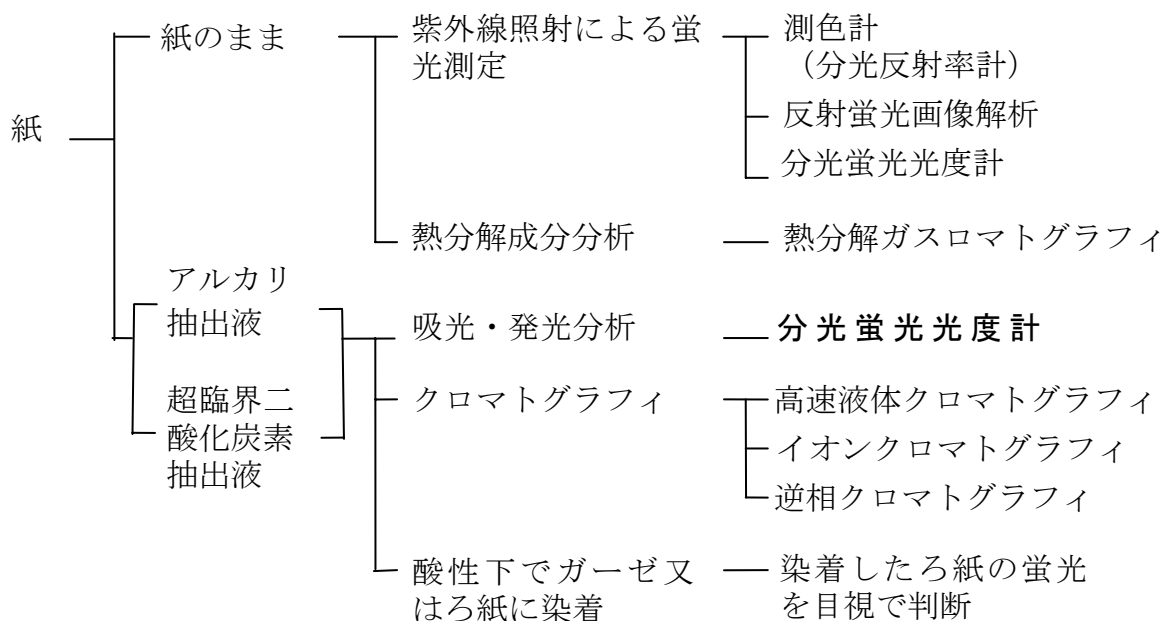
2.3. 定量方法

定量的な測定方法として、次に示す方法をすべて検討した。

この中で定量法として適用可能と考えられる(1)分光蛍光光度計 日立製 F-2500、(2)蛍光画像取り込み装置 バイオラッド製 MultiImager Fluor-S について取り上げる。(1)では石英セルに水溶液を入れ、正面(0°)から照明し 90° 方向での蛍光を測定した。(2)は紫外線のみを照射し、可視光領域での反射画像を高解像度の CCD カメラにより撮影した。試料は暗室内のガラス板ステージ上におかれ、レンズから試料までの距離 0.75m、絞り f 値 22、紫外線照射時間 20s に設定して撮影した。カメラの CCD センサ前の色フィルタは使用せず、照明光のモードは落射紫外線照明を意味する Epi:UV に設定した。通常の近紫外線照明（ブラックライト）の蛍光灯が 2 本左右に並んでおり、紫外線強度は、試料の位置が離れすぎると誤差が大きくなる懸念はある。しかし、露光時間や積算回数の設定が自由に行え、CCD センサの輝度分解能も 16 ビット（65536 階調）と高いことが特長である。実際には、撮影した蛍光画像の輝度について 256 階調に丸めて輝度を調べた。

2.4. 超臨界二酸化炭素による抽出法の検討

染料は超臨界二酸化炭素に溶解することが知られており、溶解のメカニズムや温度及び圧力条件の影響などの報告がある^{8, 9)}。廃水を出すことなく合成繊維¹⁰⁾や綿繊維¹¹⁾、タンパク質繊維¹²⁾を染色する技術に広く応用されている。



2.4.1. 抽出条件の検討

超臨界二酸化炭素でそのまま抽出できる成分もあるが、モディファイア（共溶媒又は添加剤）の種類を変えることにより蛍光増白剤の溶解性を上げ、抽出量を高くできる条件を検討した。モディファイアとしてよく用いられるイオンペア^{13, 14, 15)}を本研究でも検討した。

蛍光増白剤は 2.1 と同一の 1 % 濃度の水溶液 200 μL を採取して、直径 70 mm のろ紙に吸収させ、風乾した。吸収むらを考慮して、5 mm 幅の短冊状に切断し、ろ紙 1 枚分の半量（条件 3 では 1 枚分）を抽出用試料とした。

超臨界二酸化炭素による抽出（以下 SFE 抽出と呼ぶ）は表 1 に示す 5 つの条件で行った。水／メタノール共溶媒、及び酸又は塩基等のモディファイアは、超臨界二酸化炭素と同時に流した。抽出容器は固体用 10 mL の物を用い、抽出時間はどの条件でも 60 分とした。

2.4.2. 高速液体クロマトグラフィ（HPLC）による定量

SFE 抽出物は水に溶解して 100 mL とした。これは、蛍光増白剤全量を抽出できたとすると 10 ppm 濃度に相当する。定量のための参照用標準試料には 1 ppm 濃度に希釈した蛍光増白剤水溶液そのものを用いた。標準試料及び抽出物水溶液は、10 μL を採取し 0.45 μm 径のメンブランフィルタでろ過してからに HPLC に注入した。カラム及び蛍光検出器は、CrestPak C18S（内径 4.6 mm×長さ 150 mm）及び FP-2020（両者とも日本分光製）を用いた。測定条件は以下の通りとした。移動相に 50 mM 濃度のリン酸二水素カリウム/アセトニトリル=72/28 水溶液を用いた。カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とし、蛍光検出器の条件は、励起波長 346 nm、検出波長 435 nm とした。

3. 結果と考察

3.1. 分光蛍光光度計による定量法

図 2 は、分光蛍光光度計を用いて測定した蛍光増白剤水溶液の蛍光特性を示す。照明（励起）波長と検出（蛍光）波長をそれぞれ一定範囲で 5 nm ごとに変化させて全ての組み合わせでの蛍光（通常の散乱光を含む）強度を測定し、3 次元的に表示した。照明波長＝検出波長となるうねのピークが通常の同一波長での散乱光（レイリー散乱）で、その真下に来るやや勾配の小さいものがラマン散乱を示し、EM 軸の中ほどからさらに小さい勾配で伸びているものが照明波長のちょうど 2 倍となる二次光である。蛍光増白剤による蛍光は中央部やや右よりの二山になったピークと考えられ、波長は、励起/蛍光 (nm) = 275/430 及び 330/430 であった。ピークが 2 つ存在するのはジ体、テトラ体に対応する可能性を示唆するが、詳細は検討していない。図は濃度 100 ppb の溶液に対してであるが、このピークを示す波長の対は 10 ppb～10 ppm の広範囲で一貫性があった。蛍光強度の対数に対しては、この 3 桁にわたる濃度範囲でも濃度との間に直線性が見られたが、精度は高くなかった。以上の結果から定量法として可能性があるが、精度についてはさらに検討する必要がある。

3.2. 蛍光画像による定量法

図 3 は、標準染着ろ紙試料を撮影した蛍光画像である。各試料上に見える水玉模様のような痕跡は、CCD カメラ内部の露結による水滴で、試料の特性とは無関係である。平均グレースケールの計算では、この水滴部分を含まない画素だけを対象とした。蛍光増白剤濃度の高い溶液から染着させたる紙の方が明らかに大きい蛍光強度を示した。Blank は対照のろ紙である。図 4 はこの画像における各試料部分の輝度を示す。縦軸は 0~255 の輝度、横軸は 1 ppb~100 ppm の濃度をそれぞれ対数で表示した。直線性は認められたが、ばらつきが大きく、完全な定量的な測定としては不完全である。しかし、ここで得られた近似直線を以後の濃度推定計算用の基準とした。

図 5 は、染着時の pH が蛍光発光量に与える影響を蛍光画像の輝度から検討した結果である。肉眼で明るさを判断するときは、光量や輝度そのものより光学濃度に相当する対数の方が感覚に合うので縦軸は対数表示とした。染着時の pH が 2.3 のとき最大の蛍光発光を示した。スルホン酸基の解離が抑えられ、ろ紙のセルロース表面の水酸基と強く水素結合するためと考えられた。しかし、それ以下に pH を下げても染着量は上がらなかった。pH を 3 以上に高くすると染着量は少しずつ減少したが、安定はしなかった。これらの結果は直原ら³⁾の結果と一致している。

表 2 は高濃度のアルカリ処理により蛍光増白剤を除去できるかどうかを検討した結果である。残存蛍光増白剤濃度は図 4 の関係から求めた。pH13.0 のアルカリ濃度下にパルプをおいても、水素結合又は分子間力により繊維表面と強く結合した蛍光増白剤のほとんどすべてが除去されたわけではなく、その後の pH9 での抽出でも抽出された。同一パルプから pH9 で抽出する場合、何回抽出を繰り返して行っても同程度の濃度の蛍光増白剤が抽出されることもあり、pH9 の条件では、紙中の蛍光増白剤のうちのごく一部を抽出しているに過ぎないようである。したがって pH13.0 のアルカリ処理もごく一部を除去しているに過ぎなかったと推測される。しかし、対照となる pH6.8 での抽出では輝度レベルは 255 で飽和しており、実際の蛍光発光はそれ以上であると考えられるので中性条件はアルカリ条件に比べると抽出量が少ないことは明らかである。

図 6 は、次亜塩素酸ナトリウムによる酸化分解によって蛍光増白剤の除去がどの程度できるかを評価する際に、次亜塩素酸濃度がどの程度影響するかを検討した結果である。1 ppm の次亜塩素酸濃度で 1 ppb 程度にまで蛍光増白剤濃度を低下させることができることがわかった。食品包装用の原料として許容されるレベルは、おおよそ 1 ppb 程度以下で、このレベルに一致する。しかし、この酸化反応は化学構造のどの部分を酸化することによるのかは特定できない。また、蛍光を失うことが、無害な物質に変化することを意味するののかも実際にはわかっていない。

3.3. 超臨界二酸化炭素による抽出量と HPLC 定量法

図 9 は、表 1 に示す条件 5 による超臨界二酸化炭素抽出蛍光増白剤の HPLC によるクロマトグラムである。保持時間 8.8 分に現れる約 280 mV のピーク、9.7 分に現

れる約 30 mV の小さいピーク、12.9 分に現れる約 590 mV の大きいピークが蛍光増白剤由来と考えられる。この蛍光増白剤は、スルホン酸基がつく数により 3:6:1 のジ体、テトラ体、ヘキサ体からなっているが、ピーク強度から考えると、保持時間の短い方からジ体、ヘキサ体、テトラ体と考えられる。一般に高分子量の物質ほど保持時間は短くなるが、イオン強度の方がカラムとの相互作用に大きく影響し、逆順になったものと考えられる。どの条件で抽出してもピークが現れる保持時間及び各ピークの強度比はほぼ同じであった。

抽出量は、この 3 つのピークの総面積に比例するものとし、蛍光増白剤水溶液そのものの標準試料で測定したクロマトグラムのピーク面積との比較から各条件での抽出量 (%) を計算した。表 3 にその結果を示す。溶媒に水を混合しなかった条件 1 及び 4 ではほとんど抽出されなかった。水/メタノールの混合溶媒を添加したもののうち、有機酸を添加したものは抽出量が少なく、温度の違いはあるにせよイオンペアを高濃度で加えたものの方が少なくなる傾向にあった。解離しているイオンが却って溶出の妨げになったものと考えられる。一方有機塩基を添加したものは、抽出量が 97.9 % と、ほぼ全量を抽出できた。主溶媒が臨界流体であってもアルカリ水溶液で抽出されることは同じであることがわかった。なお、イオンペアの効果については、添加濃度 1 水準でのみ抽出を行っているためその効果を判断することはできない。

4. 結論

蛍光増白剤定量法として試みた分光蛍光光度計及び蛍光画像法は、ある程度の定量性があつたが精度が十分高いとは言えない。高濃度アルカリによる蛍光増白剤の除去効果は低い、次亜塩素酸は分解効果が高かった。超臨界二酸化炭素による抽出と HPLC-蛍光検出器による分離定量法では、水及び有機塩基を加えたアルカリ条件では、ろ紙からほぼ全量のスチルベン系蛍光増白剤を抽出できた。また HPLC ではスルホン酸基置換度による分離と定量が可能であった。

謝辞

実験に際し多くの有用な情報を頂いた王子製紙の宮川孝氏、尾松正元氏、直原孝之氏、並びに蛍光増白剤試料をご提供頂いた日本化薬カラーズ、古紙パルプをご提供頂いた三菱製紙、超臨界二酸化炭素による抽出と測定にご協力頂いた日本分光に感謝します。

文献

1. 赤松昂, 松尾昌季, 紙パ技協誌 27(4): 164-170 (1973)
2. 宮川孝, 尾松正元, 直原孝之, 新井直人 紙パ技協誌 59(2): 209-215 (2005)
3. 直原孝之, 田原江利子, 唐晨瑩, 外崎英俊, 宮川孝, 紙パ技協誌 59(8): 1206-1213(2005)
4. Whitten, J. E. and Alfano, J. C., J. Pulp Paper Sci. 25(1): 21-24 (1999)

5. 蛍光増白現象とその原理, 日本化薬カラーズ編(2004)
6. 特開平 04-91284 古紙中の蛍光反応消去法 (1992)
7. 特開 2005-273091 古紙の処理方法 (2005)
8. Sawada, K., Takagi, T. and Ueda, M., Dyes and Pigments 60(2): 129-135 (2004)
9. Gordillo, M.D., Pereyra, C. and Martinez de la Ossa, E.J., Dyes and Pigments 67(3): 167-173 (2005)
10. Ozcan, A.S. and Ozcan, A., J. of Supercritical Fluids, 35 (2):133-139 (2005)
11. Fernandez Cid, M.V., van Spronsen, J., van der Kraan, M., Veugelers, W.J.T., Woerlee, G.F. and Witkamp, G.J., J. Supercritical Fluids 39(3): 389-398 (2007)
12. Sawada, K. and Ueda, M., Dyes and Pigments 63(1): 77-81 (2004)
13. Wang, T. and Wang, X., Sensors and Actuators B: Chemical 89(1-2): 144-149 (2003)
14. Ozcan, A.S. and Ozcan, A., J. Supercritical Fluids 37(1): 23-28 (2006)
15. Ozcan, A. and Ozcan, A.S., Fluid Phase Equilibria 249(1-2): 1-5 (2006)

Table 1 Conditions for extracting fluorescent brightening agent from dyed filter paper with superfluid CO₂

		SFE condition				
		1	2 [*]	3	4	5
Superfluid CO ₂ flow rate , mL/min		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Modifier						
Organic acid/base	TFA (trifluoroacetic acid) conc., %	0.1	0.1	0.1	-	-
	DEA (diethylamine) conc., %	-	-	-	0.1	0.1
Ion-pairing agent	TBA (tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate) conc., mM	-	5	20	20	20
Solvent	H ₂ O/Methanol ratio	0/100	50/50	50/50	0/100	50/50
Flow rate, mL/min		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Temperature, °C		40	80	120	80	120
Pressure, MPa		30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
* The specimen used for extraction in condition 1 was used again in condition 2.						

Table 2 Effect on elimination of fluorescent brightening agent (FBA) by alkali treatment

pH at alkali treatment	Gray level (0-255)	Estimated concentration of FBA (ppb)
6.8(deionized water)	255	1190
11.5	251	1170
13.0	247	1140

Table 3 HPLC-estimated amount of fluorescent brightening agent
(FBA) extracted with superfluid CO₂

SFE condition	Total peak area, mVs	Extracted FBA, %
1	12861	0.1
2	4446816	24.4
3	5257016/2	14.4
4	595667	3.3
5	17858567	97.9
Standard for reference	1824742	(10)

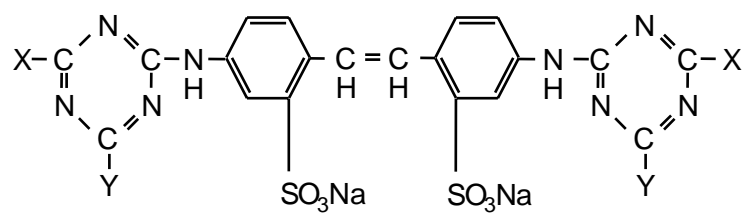


Fig. 1 Fluorescent brightener with a stilbene moiety

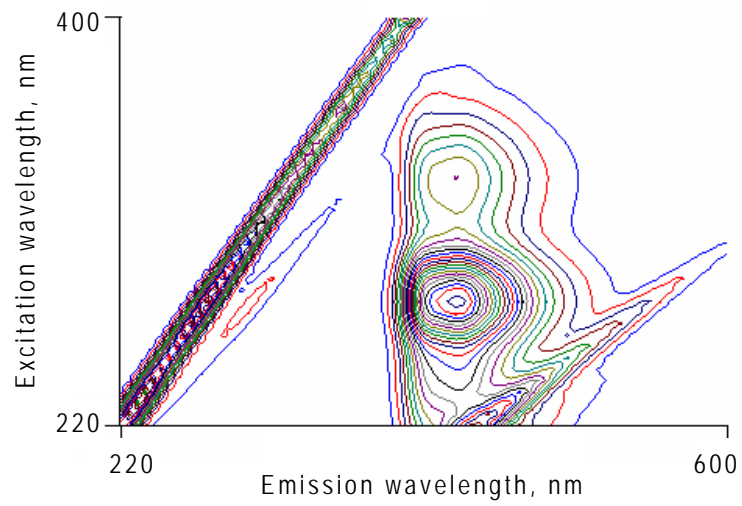


Fig. 2 Fluorescence intensity of 100 ppb of stilbene brightener at varied excitation and emission wavelengths

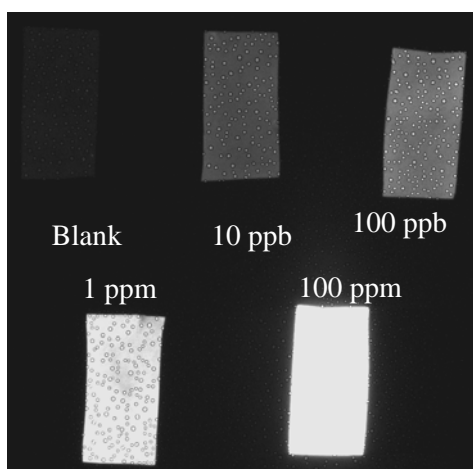


Fig. 3 Fluorescence image of fluorescent brightener-stained filter paper

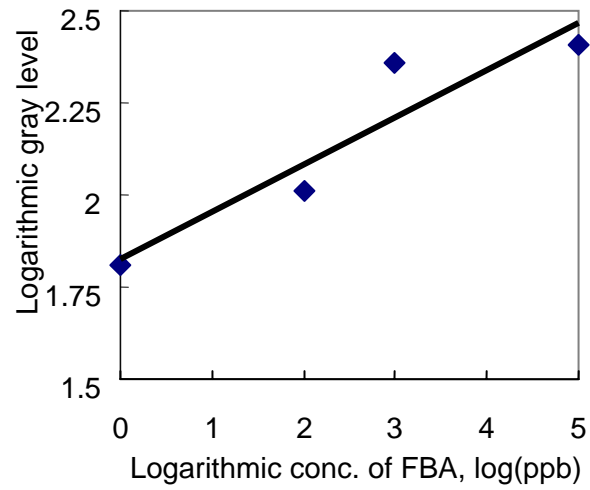


Fig. 4 Gray level of UV-excited image of filter paper dyed with fluorescent brightening agent (FBA) –on both logarithmic scales

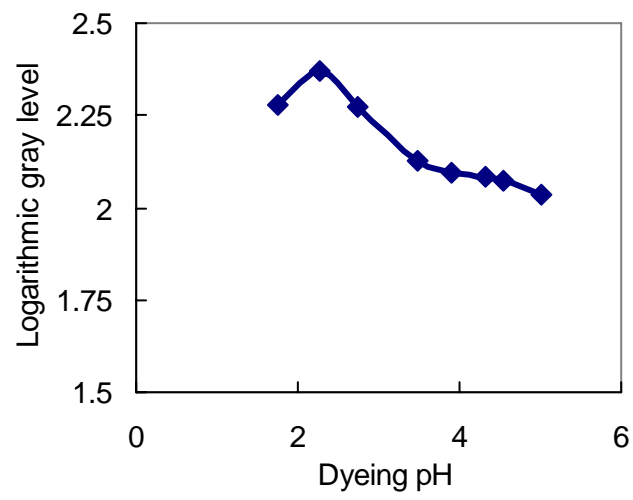


Fig. 5 Effect of pH during dyeing filter paper with FBA solution on its estimated concentration

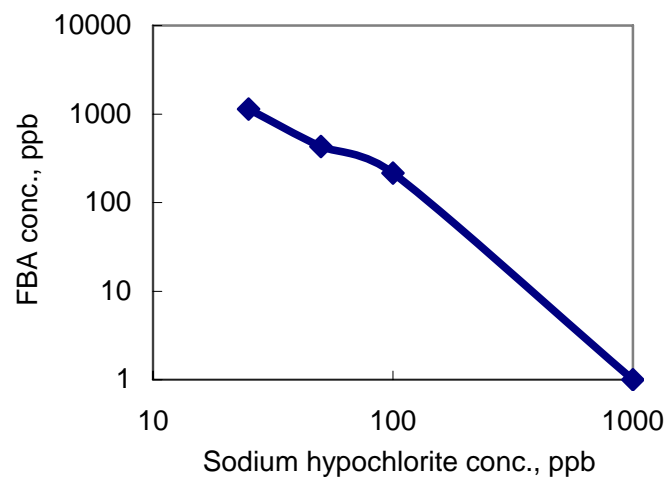


Fig. 6 Effect of sodium hypochlorite on removal of Fluorescent brightening agent (FBA)

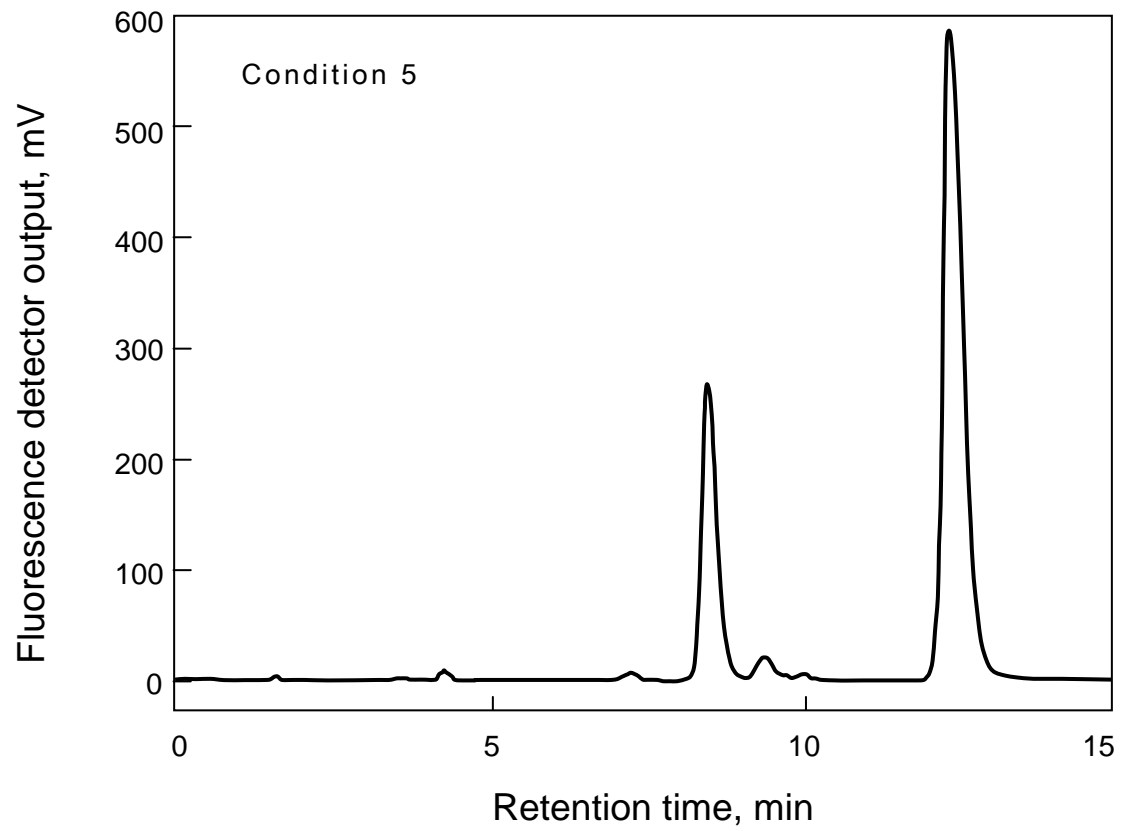


Fig. 7 Chromatogram of optical brightener extracted with supercritical carbon dioxide measured by high performance liquid chromatography (HPLC)

和文概要

食品衛生法では蛍光増白剤を食品包装容器用の板紙に添加することが禁止されている。しかし、古紙パルプから製造する板紙には、ある程度の量の蛍光増白剤は必然的に混入してしまう。適切な分解と除去を行うために、蛍光増白剤の定量方法について検討を行った。分光蛍光光度計によって測定した蛍光強度の対数は、10 ppb～10 ppm の範囲では、蛍光増白剤水溶液濃度の対数とおおよそ直線関係があった。古紙パルプから pH 9 で蛍光増白剤を抽出し、pH 3 でろ紙にそれを染着させた。染着ろ紙の蛍光画像を CCD カメラで撮影したところ、画像の輝度レベルの対数は蛍光増白剤濃度の対数と直線関係があった。蛍光増白剤の除去に関しては、pH 13 までのアルカリ処理では除去量に限界があったが、1 ppm の次亜塩素酸では蛍光強度を 1000 ppb から 1 ppb 相当まで低下させることができた。超臨界二酸化炭素による蛍光増白剤抽出後、高速液体クロマトグラフィーで定量する方法では、モディファイアとして水と有機塩基を添加するアルカリ条件下でほぼ全量の蛍光増白剤を抽出できた。

紙に含まれる蛍光増白剤の定量方法に関する検討^{2*}

(東京大学大学院農学生命科学研究科) 加地麻衣子, 江前敏晴, 磯貝明

A study on quantitative determination of fluorescent brightening agent contained in paper

Maiko Kaji, Toshiharu Enomae and Akira Isogai

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

1. Introduction

Paper has been used as a packaging material for a long time. As it is recyclable and bio-degradable, it is predicted that paper will be more widely used for packaging. Paperboard for packaging contains a large amount of recycled pulp. What recycled pulp is produced from and how it is distributed are usually unknown. There is risk in which toxic compounds may contaminate it. Though paperboard is rarely in direct contact with food, the contact may accidentally happen in shops or at consumer's houses.

Food in general is imported into Japan, and its volume is increasing. According to data by Ministry of Finance, the imported weight of food that belongs to the group 20 (vegetables, nuts and part of vegetables processed) increased by 43 percent in 8 years from 1998 to 2006. That of the group 21 (other processed food) increased by 62%. At exporting countries, food may contact paperboard that contains poisonous compounds, and then is exported. As BSE and bird flue are attracting concerns with regard to safety and science of food, it is necessary that paperboard is free from health risk in its use. Though data claiming that fluorescent brightening agents (abbreviated as FBA) are not poisonous to human¹⁾ were published, there still remains some doubt of causing cancers because of its chemical structure close to di-amino-stilbene that is very cancerous. As long as FBA is synthesized, the risk of causing health problems by its contamination to food through contact and carryover is not completely denied. From this standpoint, it may be required to remove or decompose FBA in recycling processes. As there is no method available at the moment, study to find the way of its removal and decomposition will be required in the future.

Food Sanitation Law prohibits adding fluorescent dyes when containers are produced. If a small amount of them is used, intentionally or not, it is difficult to identify them. Therefore, enforcing the prohibition is not an easy job. As FBA emits fluorescence by ultraviolet light even at the concentration of 10 ppb, and can be visually observed, it is likely to be the target of the prohibition. The method to test the presence of FBA is specified by Food Sanitation Law. FBA in a paper sample is extracted in an alkaline condition. Then gauze is immersed and dyed in that extracted solution under an acidic condition, and is visually inspected

under ultraviolet light. The method is not quantitative, and may induce too severe restriction because of its easiness of test.

The paper industry is working to use more recycled pulp as its target. It is very common that recycled pulp made from printing paper that contains much FBA is used for making paperboard. Too severe restriction against FBA contamination may completely disrupt the recycling system. Miyagawa²⁾ and Jikibara³⁾ studied the case, and advised to modify the testing method. The advice was taken into the law. The case where paper is laminated with polyolefin film to prevent its direct contact with food has changed to be out of the regulation, just as in foreign countries.

The notice “Detective method of fluorescent materials in equipment and packaging materials” announced by Food Safety Department, Medicine and Food Division, Ministry of Health labor and Welfare, in January, 2004, defines conditions where the method is applied. According to it, package of which surface does not have direct contact with food and which is hygienically clean is not subjected to the test. When fluorescence emission is not strong enough to be observed, it has to be confirmed by its producer whether fluorescent dyes are used or not. The pH range used to dye gauze with extracted FBA solution has to be narrow enough from 3 to 3.5. There are standard photos for reference to be compared with at visual inspection. These revisions help to make the analysis more accurate and objective, and are very advantageous to the paper industry.

Even though the detective method is modified to be objective, it is considered to be necessary to study once again whether FBA is poisonous or not. There is still some vagueness in measuring fluorescence emission intensity by visually comparing them with the standard photo reference. Therefore, quantitative methods are definitely needed. There was a method using fluorescence spectrophotometer of simple design as a practical quantitative way. Pulp slurry of about 0.5 % consistency was exposed to the light whose wavelength was from ultraviolet to 465 nm generated from blue light emission diode. The reflection light whose wavelength was above 515 nm was collected by fluorescence spectrophotometer. There was a high correlation between FBA concentration and fluorescence intensity in the range where FBA concentration was from zero to 2500 ppb⁴⁾.

So, we investigated the possibility of these and other quantitative methods.

2. Experiment

2.1 Fluorescent brightening agent (FBA)

Kayaphor NV liquid by Nippon kayaku Colors was used as a sample, as it has a stilbene structure and is widely used in the Japanese paper industry. This FBA has a structure shown in Fig.1. Its double bond in the center can be either cis- or trans-form. Only trans-form can emit fluorescent light. Trans- form is easily converted to cis- form by heat and

ultraviolet light. In *cis*- form, two benzene rings in a stilbene structure can not be coplanar each other by steric hindrance. Once transformed to *cis*-, FBA's affinity to cellulose is reduced. It also changes the absorption spectrum, and quits the adsorption at around 350 nm which is necessary for fluorescence emission, and results in the loss of brightening power⁵⁾. Sulfonate function group can be replaceable at X and Y of its structural formula, and di-, tetra- and hexa- substituted compounds can exist. Usually, tetra-FBA is a mixture of them at the ratio of 3:6:1. FBA was delivered to us at 27 % solids. We assumed FBA of that solid content as the base of 1, and it was diluted with deionized water. The concentration of diluted FBA was expressed as a volume ratio like ppm and ppb.

2.2 Paper samples

2.2.1 Standard filter paper sample dyed with FBA

100 ml of the solution of FBA of 2.1 was adjusted to pH 3 with dilute hydrochloric acid. Filter paper (Qualitative No.2 by Advantec) whose size was 20 mm x 60 mm was immersed in the FBA solution at 60 °C for 30minutes. After being dyed with FBA, the filter paper was air dried.

2.2.2 Pulp sample and extraction of FBA

The pulp sample was recycled pulp made from fine paper by Mitsubishi Paper Mills. It contained newly-added FBA besides that originating from fine paper used. 2.0 g of the pulp (as B.D.) was subjected to extraction with 100 ml of dilute ammonia solution of which pH was 9 at 60 °C for 10 min. It was filtered through a wire. The filtrate was adjusted to several levels of pH in the range from 7.0 to 5.0 to determine the effect of pH at dying with FBA. Filter paper was immersed in the solution for 30 minutes at a room temperature to dye it with the extracted FBA.

2.2.3 Study on conditions of removing FBA

Two methods were attempted to remove FBA. One was to use hypochlorite which is already well known for decomposing FBA^{5, 6)}. The other was to use alkaline solution of high concentration. Sodium hydroxide solution was added to 80 ml of pulp slurry of which consistency was 3 % in such a way that its final volume was 100 ml and the final pH was 11.5 and 13.0, respectively. The pulp slurries were kept still for 20 minute at 60 °C. A reference was prepared with the same procedure, using deionized water instead of sodium hydroxide. The slurry was filtered and the residue (pulp) was well washed, of which handsheets were prepared. Then, FBA was extracted from the handsheets at pH 9, and filter paper was dyed with the extract at pH 3.

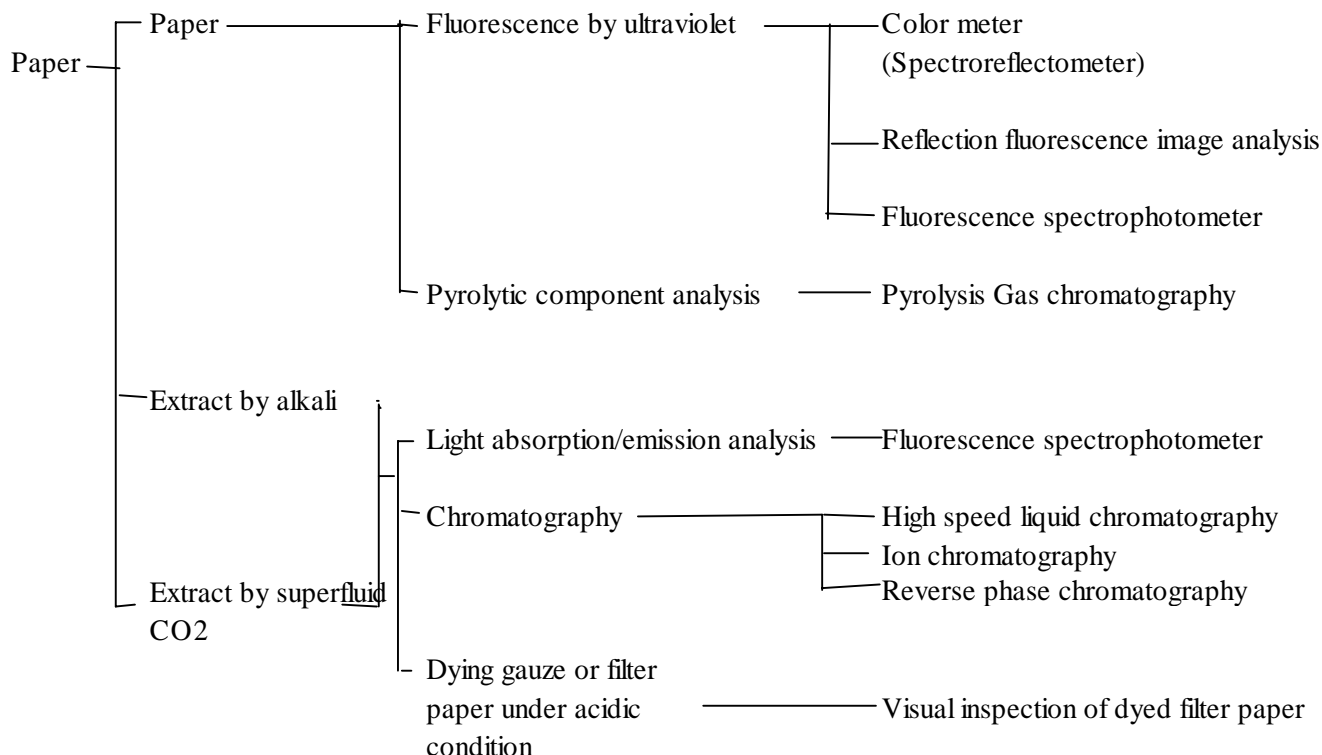
In the hypochlorite treatment, sodium hypochlorite solution was added to 80 ml of pulp slurry to make its concentration 0, 25, 50, 100 and 1000 ppb, respectively. Subsequent

procedures following on were the same with those in the extraction with sodium hydroxide.

Filter paper dyed was used for photographing its fluorescence image.

2.3 Quantitative methods

All the quantitative methods listed in the following chart were taken into considerations.



From them, two methods were applicable quantitatively. One was fluorescent spectrophotometer (F-2500 by Hitachi Co.) and the other was fluorescence imager (MultiImager Fluro-S by Bio-Rad Laboratories). In the former method, a quartz cell that was filled with solution was lighted from the front, and its fluorescent radiation was measured at an angle of 90 degrees. In the latter case, only ultraviolet light was applied and the reflection image in the visible light band was photographed by CCD camera. A specimen was located on a glass stage in a black chamber. The distance from a specimen to lens was 0.75 m. f value (iris) was 22. Ultraviolet light was applied for 20 seconds. A color filter ahead of CCD was not used. The mode of illumination was Epi:UV that meant applying ultraviolet light from above.

Two normal fluorescent tubes of near UV light (black light) were arranged in parallel on both sides. If lights were located too far from the specimen, error in UV intensity might be larger. However, the equipment is designed to permit to set exposure time and number of repetition in average calculation to any levels. The resolution of brightness of the CCD sensor was as high as 16 bit (85536 grades). In practice, the brightness of fluorescent image

was resolved to 256 levels.

2.4 Extraction by superfluid carbon dioxide

It is well known that carbon dioxide in a supercritical state dissolve dyes, and there are reports on the mechanism of the dissolution and the effect of temperature and pressure on the dissolution^{8, 9)}. The technology is used to dye synthetic fiber¹⁰⁾, cotton fiber¹¹⁾ and protein fiber¹²⁾ without any waste effluent.

2.4.1 Conditions of extraction

Superfluid carbon dioxide can extract some part of FBA. We studied to increase the extraction by selecting modifiers (co-solvents and additives) which helped the solubility of FBA. Ion pairs used as modifiers^{13, 14, 15)} were used in this paper.

FBA referred-to in 2.1 was also used. 200 μ L of its 1% solution was absorbed by filter paper of which diameter was 70 mm. After air dried, the filter paper was cut into strips of 5 mm width, taking into account of uneven absorption. A half of them were used for extraction. In the condition 3, the whole paper was used.

The extraction by superfluid carbon dioxide (abbreviated as SFE extraction) was carried out in five conditions in Table 1. Water/methanol co-solvent and modifiers such as acid or base were passed together with superfluid carbon dioxide. A vessel for solid extraction was used and the volume was 10 mL. The extraction time was 60 minutes in all cases.

2.4.2 Measurement by high performance liquid chromatography (HPLC)

The extract by SFE was dissolved with water to 100 ml. If all FBA was extracted, the concentration would be 10 ppm. As a reference for qualitative measurement, FBA solution of 1 ppm was prepared. 10 μ L of the solution was taken out, filtered through 0.45 μ m membrane filter and injected into the HPLC. The column was CrestPak C18S (4.6 mm in inside diameter and 150 mm in length), and the fluorescence detector was FP-2020, both manufactured by JASCO Corp. The measurement condition was as follows: the kind of eluent, its concentration and column temperature were potassium di-hydro phosphate/acetonitrile (72/22), 50 mM and 40°C, respectively. Regarding the fluorescence spectrophotometer, the excitation and detection wavelengths were 326 nm and 435 nm, respectively.

3. Result and discussion

3.1 Measurement by fluorescence spectrophotometer.

Fig.2 is the fluorescence spectrum of FBA solution measured by fluorescence spectrophotometer. Selecting excitation wavelength at an interval of 5nm in a certain range, and measuring emitted fluorescence intensity (including normal scattered light) at the same

interval on every selected excitation wavelength, a three dimensional chart was obtained. The ridge of high intensity in the zone, where the wavelength of excitation was equal to that of emitted light, represented the intensity of scattered light (Rayleigh scattering). One ridge below that of small height was by Raman scattering. A ridge extending with a low gradient from the center of EM axis was for the secondary light whose wavelength was twice the illumination wavelength. Fluorescence by FBA appeared a little right from the center of the two peaks. The ratio between the wavelength of excitation and that of emission was 275/430 and 330/430, respectively.

The presence of the two peaks suggested that there were *di*- and *tetra*- substituted compounds. We, however, have not studied yet in detail. Fig.2 was for the solution of 10 ppb. These two peaks always appeared with solutions ranging from 10 ppb to 10 ppm. Linearity was found between the logarithm of fluorescence and the concentration in the wide range covering the third power of ten. But, the accuracy was not enough, and has to be investigated further.

3.2 Quantitative measurement by fluorescence image

Fig. 3 shows fluorescence images of the standard filter paper samples dyed. Droplet patterns seen on the samples were caused by water droplets dewed inside the CCD, and were indifferent from characters of the samples. When we calculated the average gray level of a sample, pixels which did not belong to droplets were taken into the calculation. The sample which was dyed by FBA solution of higher concentration gave definitely higher intensity. The blank in Fig.3 was a reference filter paper. Fig. 4 shows the relationship between the brightness of the sample and the FBA concentration used to dye it. The vertical axis is for the brightness from zero to 255, and the horizontal axis is for the concentration from 1 ppb to 100 ppm. They are in a logarithmic scale. Though the linearity was observed, it was not enough for quantitative measurement. But, the regression was used as a calibration line for estimating concentrations in the following discussion.

The effect of pH in dyeing was depicted in Fig. 5, using the brightness of fluorescence images. When the brightness is visually inspected, its logarithmic value which corresponds to its optical intensity fits to human sense more than its light intensity and brightness itself. So, logarithmic values were used in Fig. 5. The highest emission was observed at a dyeing pH of 2.3. At this pH, sulfonate groups were supposed to be less ionized and combined with hydroxyl groups of cellulose of filter paper to form strong hydrogen bonding. At lower pH than that, no further increase was observed. At higher pH than 3, the dyed amount was gradually decreased, and was not stable. This result was in good agreement with that by Jikibara³⁾.

Whether FBA could be removed by a treatment of high alkaline solution was examined, and the result is in Table 2. Residual FBA concentration was calculated based on the

relation of Fig. 4. When a pulp was treated with alkaline solution of pH 13, FBA was not always removed completely due to strong bonding to pulp surfaces by hydrogen bonding or intermolecular force. There was a sample from which FBA was extractable at pH 9 after preceding extraction at pH 13. When one pulp sample was subjected to extraction repeatedly at pH 9, almost the same amount of FBA was extracted at every extraction. Therefore, it seems that only a part of FBA was extracted at pH 9. Judging from these facts, it was suggested that even the treatment by alkaline solution at pH 13 removed only some part of FBA. The gray level for the pH 6.8 extraction as a reference was saturated at 255. Its real fluorescence emission was supposed to be more than that. It was obvious that the treatment at neutral pH was less extractive than the treatment in alkaline pH.

FBA is decomposed by sodium hypochlorite. The effect of hypochlorite concentration on the decomposition was examined, and the result is shown in Fig.6. Hypochlorite solution of 1 ppm reduced FBA concentration down to 1 ppb. The FBA concentration which is allowed to food packaging materials is less than 1 ppb and the concentration in this condition agreed to this level. It is not clear which part of the chemical formula of FBA was oxidized. It has not been also known yet whether losing fluorescence means that FBA is converted to non-poisonous structures.

3.3 Extraction by superfluid carbon dioxide and quantitative measurement by HPLC

FBA was extracted in a condition specified as No.5 in Table 1 by superfluid carbon dioxide, and was analyzed with HPLC. Fig. 7 is its chromatogram. A peak at a retention time of 8.8 min with the a height of 280 mV, a small peak at 9.7 min with a height of 30 mV and a large peak at 12.9 min with a height of 580 mV were supposed to be characteristic to FBA. As FBA was a mixture of substituted products depending on numbers of sulfonate group such as *di*-, *tetra*- and *hexa*- compounds and their ratio was 3:6:1, the peaks corresponded to *di*- , *tetra*- and *hexa*- in the order from the short retention time. In general, the larger is a molecular compound, in the shorter retention time it elutes. But, in this case, the difference in ion intensity among the compounds interacted with the column more effectively, and they eluted out in the reverse order. The condition of extraction did not affect the retention time of each peak and the ratios among the intensities of those peaks.

We assumed that the extracted amount was proportional to the total summed area of these three peaks. The total area of a reference sample that was FBA solution was taken as a ference. Comparing the area of the extracted with that of the reference, we could calculate FBA extracted amount in each condition. The result was in Table 3. In Conditions 1 and 4, where the solvent did not contain water, little FBA was extracted. When the solvent was a mixture of water and methanol, the addition of either of the organic acids to the solvent did not increase the extracted amount. This fact suggested that an ion in an ionized form might hinder the extraction. On the other hand, the addition of either of the organic bases to the

solvent worked effectively and the extraction ratio was 97.9 %. It was found that alkaline solutions were also effective for the extraction even when a main solvent was super fluid. We could not make clear comment on the effect of ion pair, as only one addition level was tested. Addition of ion pair of a higher concentration also tended to reduce the extracted amount, if the temperature difference ignored.

4. Conclusions

Fluorescence spectrophotometer and fluorescence image analysis were investigated as a quantitative method for FBA measurement. They could be quantitative to some extent, but the accuracy was not high sufficiently. Alkaline solutions of high concentrations did not remove much FBA effectively. Hypochlorite could decompose FBA very effectively. Extraction by superfluid carbon dioxide was studied along with quantitative analysis using HPLC and a fluorescence image detector. With the addition of water and the organic base to superfluid, which made the solvent alkaline, almost all FBA was extracted from filter paper samples. HPLC could separate the substituted compounds of FBA dependent on the number of sulfonate groups, and permits the quantitative analysis.

Acknowledgement

We thank Messrs. Takashi Miyagawa, Masayuki Omatsu and Takayuki Jikibara of Oji Paper Co. for their useful information. We also thank Nippon Kayaku Colors which supplied the FBA sample to us, Mitsubishi Paper Mills which supplied recycled pulp to us and JASCO Corp. which helped us with the extraction tests by using superfluid carbon dioxide.