

図2-3 陰膳試料の分析法(機関C)

均一化した検体 30 g

- ↓ アセトニトリル 150ml
- ↓ ホモゲナイズ (Ultraturax, 1分)
- ↓ 遠心分離 3000rpm, 5分,
- ↓ 残渣は 50ml のアセトニトリルで 10 分間攪拌後遠心分離

上澄液

- ↓ 食塩 10 g を加え, 攪拌子を入れ 10 分間攪拌

アセトニトリル層

- ↓ 濃縮, 残渣に酢酸エチル 30ml を加え溶解し, 少量の無水 Na₂SO₄ で脱水
- ↓ ろ過, 濃縮
- ↓ 20%アセトン-シクロヘキサン 3ml に溶解
- ↓ 3000rpm で 5 分遠心分離

Gel Permeation Chromatography

- ↓ (Shodex EV2000 2cm x 40cm, 溶媒 20%アセトン/シクロヘキサン, 流速 4ml/min)
- ↓ 2ml を注入 (20g 相当)

DNP から DEP までの分画 (13~23 分)

- ↓ 1~2ml に濃縮

フロリジル PR カラム (1g, 50%アセトン/ヘキサン, ヘキサン各 10ml で洗浄)

- ↓ 5%アセトン/ヘキサン 10ml で溶出

溶出液

- ↓ 濃縮, 2ml ヘキサンに溶解

GC/MS 測定

DEP, DPrP は DEP-d4 で補正

DBP, DPeP, DHexP は DBP-d4 で補正

BBP は BBP-d4 で補正

DEHA, DcHP, DEHP は DEHP-d4 で補正

DOP は DOP-d4 で補正

DiOP, DiNP は DNP-d4 で補正

図 2-4 陰膳試料の分析法(機関 D)

均一化した試料 50g

- ↓ アセトン 100ml
- ↓ 振とう 5分
- ↓ グラスフィルターでろ過
- ↓ 残渣は 100ml のアセトンを加え同様に操作

ろ液

- ↓ 濃縮・溶媒留去
- ↓ 10%食塩水 50ml
- ↓ 酢酸エチル/ヘキサン(1:2) 50ml × 2 で抽出

有機層

- ↓ 無水 Na_2SO_4 10g で脱水
- ↓ グラスフィルターでろ過

ろ液

- ↓ 濃縮
- ↓ ヘキサン 10ml に溶解
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 20ml × 3 で抽出

アセトニトリル層

- ↓ 濃縮・溶媒留去(残留物が 1g 以上の場合は 1g 分取)
- ↓ ヘキサン 10ml
- ↓ 濃縮・溶媒留去
- ↓ ヘキサン 1ml に溶解

6%含水フロリジルカラム(1g+ Na_2SO_4 1g)

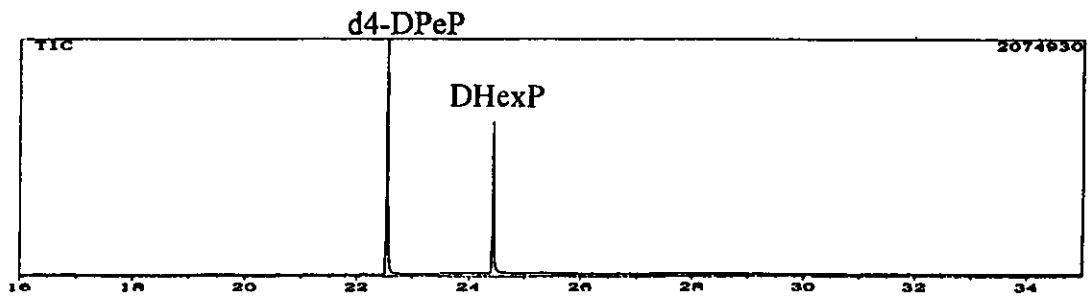
- ↓ ヘキサン 50ml で洗淨
- ↓ 0.5%アセトニトリル/ヘキサン 50ml で溶出

溶出液

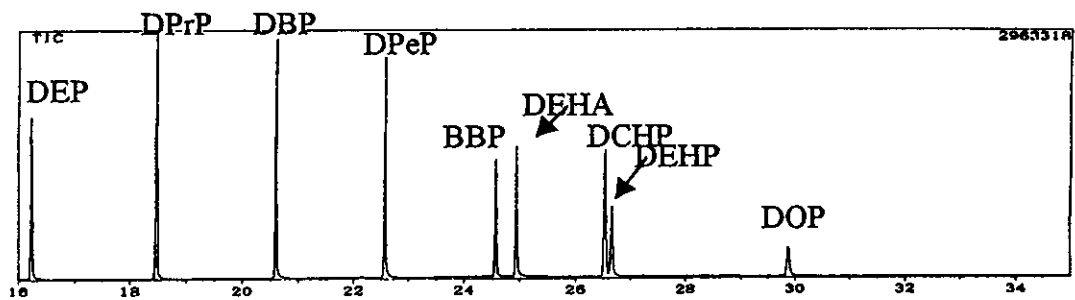
- ↓ 濃縮・溶媒留去
- ↓ ヘキサンで 2ml

GC/MS 測定

図3 フタル酸エステル(GC/MS (TIC) クロマトグラム

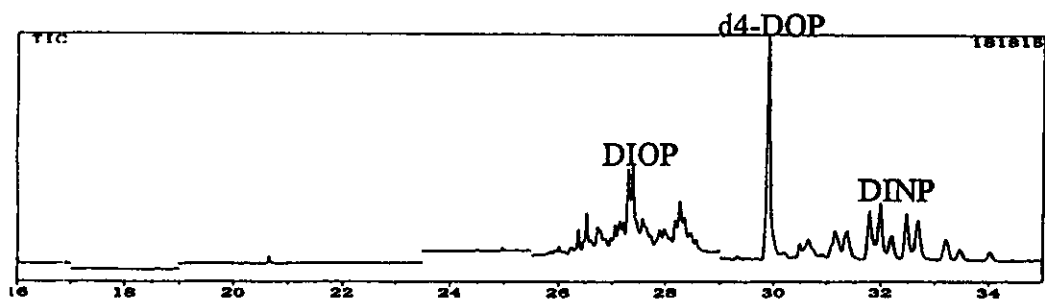


d4-DPeP, DHexP : 1 μ g/ml



DEP, DPeP, DBP, DPrP, DEHP, DOP : 1 μ g/ml

BBP, DEHA, DcHP : 2 μ g/ml



DIOP, DiNP : 5 μ g/ml

d4-DOP : 1 μ g/ml

表 1 陰膳試料分析法における操作ブランク値の日間変動と検出限界

機関A 試料: 20g	分析日1			分析日2			分析日3			分析日4		
	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD
DEP			0.7			0.7			0.8			0.6
DPrP			0.7			0.7			0.8			0.6
DBP	31.3	3.7	11	29.2	3.5	11	40.4	5.0	16	29.2	3.6	11
DPeP			0.7			0.7			0.8			0.6
DHexP			0.7			0.7			0.8			0.6
DcHP			0.7			0.7			0.8			0.6
DEHP	43.6	8.2	25	40.6	7.6	23	40	7.5	23	28.9	5.4	16
DOP			0.7			0.7			0.8			0.6
BBP	1.3	1.7	5	1.2	1.6	5	1.5	2	6	1.1	1.4	4
DiOP			0.7			0.7			0.8			0.6
DiNP			0.7			0.7			0.8			0.6
DEHA	1.3	0	0.7	1.3	0	0.7	1.6	0	0.8	1.2	0	0.6

機関B 試料: 50g	分析日1			分析日2			分析日3			分析日4		
	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD
DEP	0.1	0.2	1	0.5	0.2	1			0.1			0.2
DPrP			0.1			0.1			0.1			0.1
DBP	18.1	6.1	18	27.3	8.1	24	10.0	2.6	8	9.8	2.1	6
DPeP			0.2			0.2			0.2			0.2
DHexP			0.4			0.4			0.4			0.4
DcHP			1			1			1			1
DEHP	12.1	5.5	17	17.9	3.9	12	13.0	4.4	13	8.6	1.9	6
DOP			1			1			1			1
BBP	3.5	0.9	3	4.0	1.2	4	1.5	0.6	2	0.8	0.5	1
DiOP			10			10			10			10
DiNP			10			10			10			10
DEHA	0.6	0.6	2	0.7	0.4	1			1			1

機関C 試料: 30g	分析日1			分析日2		
	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD
DEP			0.3			0.3
DPrP			0.3			0.3
DBP	32.9	15.7	47	31.5	10	30
DPeP			0.4			0.4
DHexP			0.4			0.4
DcHP			1			1
DEHP	10.2	6.1	18	5.9	1.9	6
DOP			1			1
BBP			0.3			0.3
DiOP			20			20
DiNP			25			25
DEHA	4.8	2.2	7	4.0	2.3	7

操作ブランク(n=3-5)の平均値, 標準偏差 (SD)及び検出限界(LOD)は試料中の濃度に換算した値を(ng/g)で示した.

操作ブランクが検出されないものは, GC/MS測定のス/Nを試料中の濃度に換算した値を(ng/g)で示した.

機関D 試料: 50g	分析日							平均	SD	LOD
	1	2	3	4	5	6	7			
DEP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.11	0.04	0.1
DPrP										0.1
DBP	5.3	8.3	0.0	8.4	9.1	5.0	5.0	6	3	9
DPeP										0.2
DHexP										1.0
DcHP										0.5
DEHP	9.6	7.2	7.0	12.1	4.7	4.3	8.5	8	3	8
DOP										1
BBP	0	0	0	0	2.1	0	0	0	0.8	2
DiOP										5
DiNP										2
DEHA	0	0	0	0.9	4.9	0	0	1	2	5

表 2 バター分析法の操作ブランク値及び検出限界

	機関A			機関B n=3			機関C n=3			機関D n=3		
	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD	平均	SD	LOD
DEP	1.0	0.0	5	21.9	3.6	11	7.6	3.0	10	2.4	1.0	3
DPrP			5			3			2			3
DBP	138	30	89	245	66	199	583	154	460	154	70	211
DPeP			5			5			4			5
DHexP			5			10			4			25
DcHP			5			25			5			13
DEHP	379	173	519	347	18	53	272	68	200	204	77	230
DOP	2.0	3.5	11			25			7			25
BBP	0.5	0	5	47.7	7.2	22			5			25
DiOP			5			250			200			125
DiNP			5			250			250			50
DEHA	3.7	1.0	3	59.6	5.5	16	13.6	1.2	4			25

表 3 バターの添加回収試験結果

	機関A			機関B			機関C			機関D		
	添加 濃度	回収率(%)		添加 濃度	回収率(%)		添加 濃度	回収率(%)		添加 濃度	回収率(%)	
		平均	SD		平均	SD		平均	SD		平均	SD
DEP	250	90	6	250	88	2	200	108	6	250	95	4
DPrP	125	103	5	125	83	2	200	115	10	25	101	3
DBP	1250	97	7	1250	96	5	2000	93	6	1250	96	4
DPeP	125	97	7	125	80	1	200	99	6	25	94	5
DHexP	250	94	2	250	72	1	200	87	7	250	78	6
DcHP	250	78	8	250	69	3	200	105	10	250	90	9
DEHP	1250	113	15	1250	104	4	2000	126	44	1250	66	11
DOP	250	115	14	250	105	7	400	85	1	250	66	7
BBP	250	90	6	250	81	4	200	101	14	250	97	6
DiOP	2000	52	8	2000	108	9	2000	123	11	500	96	9
DiNP	2000	58	13	2000	110	20	2000	89	5	250	82	14
DEHA	250	57	10	250	37	23	1000	59	15	250	88	9

添加濃度: ng/g

機関A, B, Cはd-体で回収率を補正した.

: d体で補正しない場合の回収率

表 4 缶入りバターの分析値

	機関A				機関B				機関C				機関D							
	①	②	③	平均	LOD	①	②	③	平均	LOD	①	②	③	平均	LOD					
DEP	0	7	5	4	5	0	0	0	0	11	0	0	0	0	10	4	0	5	3	
DPpP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	3	
DBP	220	280	220	240	89	0	0	0	0	200	0	0	0	0	460	0	0	0	211	
DPeP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	0	0	0	5	
DHexP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	10	0	0	0	0	4	0	0	0	25	
DcHP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	25	0	0	0	0	5	0	0	0	13	
DEHP	1410	1580	1810	1600	519	2250	2100	2270	2210	53	1430	1800	1620	200	200	1420	1430	1360	1400	230
DOP	0	0	0	0	11	0	0	0	0	25	0	0	0	0	7	0	0	0	25	
BBP	110	110	120	110	5	100	100	90	100	22	120	130	130	5	120	120	98	130	120	25
DiOP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	250	0	0	0	200	200	0	0	0	125	
DiNP	0	0	0	0	5	0	0	0	0	250	0	0	0	250	250	0	0	0	50	
DEHA	110	130	130	120	5	1780	1580	1700	1690	25	590	740	670	4	550	510	320	460	25	

LOD: 検出限界
0: LOD以下

表 5 添加回収試験結果(機関D)

	添加濃度	回収率(%)						添加濃度	回収率(%)	
		弁当		馬鈴薯		精白米			バター	
		平均	sd	平均	sd	平均	sd		平均	sd
DEP	10	90.2	2.4	87.7	5.3	90.4	9.1	250	95.3	3.7
DPrP	1	97.6	2.4	91.3	3.1	100.1	10.2	25	98.9	6.9
DBP	50	77.0	2.3	88.9	3.1	87.5	10.1	1250	84.6	0.7
DPeP	1	80.6	25.3	83.2	9.6	85.7	17.9	25	88.2	14.1
DHexP	10	92.4	18.7	91.4	10.9	87.6	10.4	250	88.9	15.7
DcHP	10	71.1	2.9	88.1	2.5	84.8	9.1	250	79.4	4.6
DEHP	50	102.8	43.2	99.7	15.0	79.6	29.9	1250	55.9	7.9
DOP	10	77.2	4.3	102.1	17.2	81.6	11.2	250	67.9	4.3
BBP	10	90.0	3.3	104.8	15.0	88.5	9.4	250	81.3	2.5
DiOP	20	96.5	6.2	90.9	5.2	82.7	14.6	500	85.4	21.0
DiNP	10	93.7	3.6	107.2	17.7	88.7	12.6	250	85.3	14.6
DEHA	10	65.0	4.8	102.6	11.9	92.4	10.2	250	82.8	22.0

添加濃度: ng/g

sd: 標準偏差

表 6 (1) 実態調査結果

弁当											
機関名	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	LOD
DEP	2	0	0	0	1.2	1.6	0	1.7	1.1	1.7	0.8
DPrP	0	0	1.2	0	0	1.2	0	0	0	0.8	0.8
DBP	350	70	66	37	21	0	0	0	0	0	15
DPeP	0	0	0	0	0	0	0	0.9	0	0	0.8
DHexP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
DcHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
DEHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	23
DOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
BBP	0	0	8	57	0	0	0	0	0	0	6
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8

弁当										
機関名	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
DPrP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1
DBP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25
DPeP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2
DHexP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4
DcHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
DEHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17
DOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
BBP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2

弁当											
機関名	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0.3
DPrP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3
DBP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
DPeP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4
DHexP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4
DcHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
DEHP	59	60	250	250	580	1220	120	130	96	72	6
DOP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BBP	0	0	0	0	0	8.4	0	0	0	0	0.3
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7

表 6 (2) 実態調査結果

弁当						
機関名	D	D	D	D	D	D
試料No.	1	2	3	4	5	LOD
DEP	0	0	0	0	0	1
DPrP	0	0	0	0	0	0.1
DBP	0	0	0	27	19	7
DPeP	0	0	0	0	0	0.2
DHexP	1	3	0	0	0	1
DcHP	0	0	0	0	0	0.5
DEHP	270	190	54	190	270	40
DOP	0	0	0	0	0	1
BBP	3	12	4	17	11	2
DiOP	0	0	0	0	0	5
DiNP	7	6	42	8	4	2
DEHA	13	14	110	25	54	4

陰膳											
機関名	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	LOD
DEP	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
DPrP	1.1	0	0	0.9	0	0	0	0	0	0	0.6
DBP	31	120	0	0	50	23	30	38	47	48	11
DPeP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
DHexP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6
DcHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6
DEHP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16
DOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6
BBP	0	0	0	0	0	0	4.6	0	0	0	4.2
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6

陰膳								
機関名	B	B	B	B	B	B	B	B
試料No.	1	2	3	4	5	6	7	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	0	0.6
DPrP	0	0	0	0	0	0	0	0.1
DBP	—	—	—	—	—	—	—	25
DPeP	—	—	—	—	—	—	—	0.2
DHexP	—	—	—	—	—	—	—	0.4
DcHP	—	—	—	—	—	—	—	1
DEHP	—	—	—	—	—	—	—	17
DOP	—	—	—	—	—	—	—	1
BBP	—	—	—	—	—	—	—	4
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	10
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	10
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	2

表 6 (3) 実態調査結果

陰膳								
機関名	C	C	C	C	D	D	C	D
試料No.	1	2	3	4	1	2	LOD	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	0.3	1
DPrP	—	—	—	—	0	0	0.3	0.1
DBP	0	0	0	0	0	0	30	7
DPeP	—	—	—	—	0	0	0.4	0.2
DHexP	—	—	—	—	0	0	0.4	1
DcHP	—	—	—	—	0	0	1	0.5
DEHP	27	19	12	23	0	0	6	40
DOP	0	0	0	0	0	0	1	1
BBP	0	0	0	0	0	3	0.3	2
DiOP	—	—	—	—	0	0	20	5
DiNP	—	—	—	—	0	0	25	2
DEHA	—	—	—	—	0	5	7	4

バター								
機関名	A	A	A	D	D	D	A	D
試料No.	1	2	3	1	2	3	LOD	LOD
DEP	1	1	1	0	0	0	5	3
DPrP	0	0	0	0	0	0	5	3
DBP	0	120	0	0	0	0	89	211
DPeP	0	0	0	0	0	0	5	5
DHexP	0	0	0	0	0	0	5	25
DcHP	0	0	0	0	0	0	5	13
DEHP	—	—	—	—	—	—	519	230
DOP	—	—	—	0	0	0	11	25
BBP	0	5	7	0	0	51	5	25
DiOP	—	—	—	0	0	0	5	125
DiNP	—	—	—	0	0	0	5	50
DEHA	—	—	—	60	170	140	5	25

牛乳								
機関名	B	B	B	C	C	C	B	C
試料No.	1	2	3	1	2	3	LOD	LOD
DEP	1.6	0	0	1.8	1.2	0	0.4	0.3
DPrP	0	0	0	—	—	—	0.1	0.3
DBP	0	6	0	0	100	33	6	30
DPeP	0	0	0	—	—	—	0.2	0.4
DHexP	0	0	0	—	—	—	0.4	0.4
DcHP	0	0	0	—	—	—	1	1
DEHP	0	10	0	15	110	48	4	6
DOP	0	0	0	0	0	0	1	1
BBP	0	3	2	0	0	0	2	0.3
DiOP	0	0	0	—	—	—	10	20
DiNP	0	0	0	—	—	—	10	25
DEHA	0	3	0	—	—	—	2	7

表 6 (4) 実態調査結果

豚肉																
機関名	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	A	B	C	D	
試料No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	LOD	LOD	LOD	LOD	
DEP	0	0	1.3	0	0	0	0.3	0.7	0.3	0	0	1	2	0.3	1	
DPrP	0	0	0	0	0	0	—	—	—	0	0	1	0.1	0.3	0.1	
DBP	44	36	100	—	—	—	0	57	44	0	0	26	71	30	7	
DPeP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.2	0.4	0.2	
DHexP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.4	0.4	1	
DcHP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0.9	0	1	1	1	0.5	
DEHP	—	—	—	—	—	—	29	67	27	0	0	52	13	6	40	
DOP	2	0	0	—	—	—	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
BBP	0	0	0	—	—	—	0	0	0	0	0	1	7	0.3	2	
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	10	20	5	
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	10	25	2	
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	1	7	4	

牛肉							
機関名	B	B	C	C	C	B	C
試料No.	1	2	1	2	3	LOD	LOD
DEP	0	0	0	0	0	2	0.3
DPrP	0	0	—	—	—	0.1	0.3
DBP	—	—	0	0	0	71	30
DPeP	—	—	—	—	—	0.2	0.4
DHexP	—	—	—	—	—	0.4	0.4
DcHP	—	—	—	—	—	1	1
DEHP	—	—	33	36	47	13	6
DOP	—	—	0	0	0	1	1
BBP	—	—	0.9	0	1.6	7	0.3
DiOP	—	—	—	—	—	10	20
DiNP	—	—	—	—	—	10	25
DEHA	—	—	—	—	—	1	7

鶏肉								
機関名	A	A	A	D	D	D	A	D
試料No.	1	2	3	1	2	3	LOD	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	1	1
DPrP	0	0	0	0	0	0	1	0.1
DBP	0	0	36	0	0	14	18	7
DPeP	0	0	0	0	0	0	1	0.2
DHexP	0	0	0	0	0	0	1	1
DcHP	0	0	0	0	0	0	1	0.5
DEHP	—	—	—	0	52	41	28	40
DOP	0	2	0	0	0	0	1	1
BBP	0	0	7	0	0	0	1	2
DiOP	—	—	—	0	0	0	1	5
DiNP	—	—	—	0	0	23	1	2
DEHA	—	—	—	0	0	5	1	4

表 6 (5) 実態調査結果

魚																
機関名	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	A	B	C	D	
試料No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	LOD	LOD	LOD	LOD	
DEP	0	0	0	—	—	—	0.7	0.7	0.3	0	0	4	0.6	0.3	1	
DPrP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.1	0.3	0.1	
DBP	41	49	23	—	—	—	54	0	41	0	0	5	25	30	7	
DPeP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.2	0.4	0.2	
DHexP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.4	0.4	1	
DcHP	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	1	1	1	0.5	
DEHP	—	—	—	—	—	—	12	71	26	0	0	12	17	6	40	
DOP	0	1	0	—	—	—	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
BBP	0	0	0	—	—	—	0	0	0	0	0	1	4	0.3	2	
DiOP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	10	20	5	
DiNP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	10	25	2	
DEHA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	1	2	7	4	

ほうれんそう

機関名	B	B	C	C	C	B	C
試料No.	1	2	1	2	3	LOD	LOD
DEP	0.5	0	0	0	0	0.4	0.3
DPrP	0	0	—	—	—	0.1	0.3
DBP	18	18	0	0	0	8	47
DPeP	0	0	—	—	—	0.2	0.4
DHexP	0	0	—	—	—	0.4	0.4
DcHP	0	0	—	—	—	1	1
DEHP	120	550	110	28	36	20	18
DOP	0	0	0	0	0	1	1
BBP	3	6	0	0	0	1	0.3
DiOP	0	0	—	—	—	10	20
DiNP	0	0	—	—	—	10	25
DEHA	0	0	—	—	—	2	4

馬鈴薯

機関名	A	A	A	D	D	D	A	D
試料No.	1	2	3	1	2	3	LOD	LOD
DEP	0	0	0	0	0	0	0.7	1
DPrP	0	0	0	0	0	0	0.7	0.1
DBP	18	31	36	0	0	0	11	7
DPeP	0	0	0	0	0	0	0.7	0.2
DHexP	—	—	—	0	0	0	0.7	1
DcHP	—	—	—	0	0	0	0.7	0.5
DEHP	—	—	—	0	56	44	25	40
DOP	—	—	—	0	0	0	0.7	1
BBP	0	0	0	0	12	13	5	2
DiOP	—	—	—	0	0	0	0.7	5
DiNP	—	—	—	0	0	0	0.7	2
DEHA	—	—	—	0	0	0	0.7	4

表 6 (6) 実態調査結果

ぶどう									
機関名	B	B	B	C	C	C	C	B	C
試料No.	1	2	3	1	2	3	4	LOD	LOD
DEP	0.4	0	0	1.2	0.6	0.3	0.3	0.4	0.3
DPrP	0	0	0	—	—	—	—	0.1	0.3
DBP	10	0	30	88	0	0	0	8	47
DPeP	0	0	0	—	—	—	—	0.2	0.4
DHexP	0	0	0	—	—	—	—	0.4	0.4
DcHP	0	0	0	—	—	—	—	1	1
DEHP	25	0	0	0	0	0	23	20	18
DOP	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BBP	0	0	0	0	0	0	0	1	0.3
DiOP	0	0	0	—	—	—	—	10	20
DiNP	0	0	0	—	—	—	—	10	25
DEHA	0	0	0	—	—	—	—	2	4

りんご								
機関名	A	A	A	D	D	D	A	D
試料No.	1	2	3	1	2	3	LOD	LOD
DEP	4.3	0	0.7	0	1.6	0	0.7	1
DPrP	0	0	0	0	0	0	0.7	0.1
DBP	45	58	27	29	16	12	11	7
DPeP	0	0	0	34	1	0	0.7	0.2
DHexP	—	—	—	0	0	0	0.7	1
DcHP	—	—	—	0	0	0	0.7	0.5
DEHP	—	—	—	62	62	0	23	40
DOP	—	—	—	0	0	0	0.7	1
BBP	0	0	0	5	0	15	5	2
DiOP	—	—	—	0	0	0	0.7	5
DiNP	—	—	—	0	0	0	0.7	2
DEHA	—	—	—	40	29	5	0.7	4

精白米											
機関名	A	A	A	C	C	C	D	D	A	C	D
試料No.	1	2	3	1	2	3	1	2	LOD	LOD	LOD
DEP	1.6	0	1.0	1.4	0.7	0.7	0	0	1	0.3	1
DPrP	0	0	0	—	—	—	0	0	1	0.3	0.1
DBP	64	38	110	55	0	0	0	0	31	47	7
DPeP	0	0	0	—	—	—	0	0	1	0.4	0.2
DHexP	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0.4	1
DcHP	0	0	0	—	—	—	0	0	1	1	0.5
DEHP	110	53	49	68	0	26	0	49	20	18	40
DOP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
BBP	0	1	3	0	0	22	0	0	1	0.3	2
DiOP	—	—	—	—	—	—	0	0	1	20	5
DiNP	—	—	—	—	—	—	0	0	1	25	2
DEHA	—	—	—	—	—	—	0	0	1	4	4

LOD : 検出限界 — : データなし 0 : 検出限界以下

機関Bは各検体ともn=3の平均値

機関A, C, Dは各検体ともn=2の平均値

分担研究報告書

食品中のアルキルフェノール化合物及び 2,4-ジクロロフェノールの含有量に関する調査研究

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

内分泌攪乱性の疑いが指摘されているノニルフェノール、オクチルフェノールをはじめとするアルキルフェノール類及び 2,4-ジクロロフェノールをGC/MSで同時測定する系を確立し、各種食品中の含有量を測定した。

11 種のアルキルフェノール類 (4-n-ブチル, 4-sec-ブチル, 4-tert-ブチル, 4-n-ペンチル, 4-tert-ペンチル, 4-n-ヘキシル, 4-n-ヘプチル, 4-n-オクチル, 4-tert-オクチル, 4-n-ノニル, 4-ノニルの各フェノール) 及び 2,4-ジクロロフェノールを調査対象とし、米 (精白米) 8 検体, 野菜 40 検体, 果実 21 検体, 魚介類 39 検体, 畜肉類 41 検体, 乳製品 26 検体, 缶詰 15 検体について汚染実態調査を実施した。

その結果, 魚介類及び肉類から 4-ノニルフェノールが検出された。検出された濃度はそれぞれ 10 ~ 723ng/g, 0.3 ~ 180ng/g であった。また, 一部の野菜から 2,4-ジクロロフェノールが 0.2 ~ 11.2ng/g 検出された。その他に 4-n-ヘプチルフェノール, 4-n-ヘキシルフェノール, 4-tert-オクチルフェノール及び 4-n-ペンチルフェノール等が検出された。

研究協力者

佐々木久美子 国立医薬品食品衛生
研究所

根本 了 国立医薬品食品衛生研究所

高附 巧 国立医薬品食品衛生研究所

今中 雅章 岡山県環境保健センター

衛藤 修一 北九州市環境科学研究所

村上恵美子 北九州市環境科学研究所

合物の中には, ノニルフェノール (4-ノニルフェノール, 多数の異性体混合物), オクチルフェノールをはじめとするアルキルフェノール類, 2,4-ジクロロフェノール及びペンタクロロフェノールのようなハロゲン化フェノール類及びビスフェノールA等がある。中でもノニルフェノールは米国EPAが内分泌攪乱性が既知の物質としてリストに取り上げている。ノニルフェノールは組み換え酵母細胞を用いた試験でエストラジオールの2~5万分の1の活性を示し

A. 研究目的

内分泌攪乱性が疑われるフェノール系化

1), ヒト乳ガン細胞を使用した実験でノニルフェノールはエストラジオールの 1000 分の 1 以下, オクチルフェノールは約 1000 分の 1 のエストロゲン作用を示した²⁾と報告されている。これらのフェノール類は界面活性剤, 高分子素材の原料, 農薬製剤等に使用され, 食品を直接的, 間接的に汚染する可能性があるが, 食品中のこれらの化学物質を総合的に分析した例はほとんどない。そこで, 本研究ではこれらフェノール系化合物のうち, 11 種のアルキルフェノール類と 2,4-ジクロロフェノールの GC/MS による一斉分析法を確立し, 各種の食品を分析して, 食品中濃度を明らかにした。なお, ビスフェノール A とペンタクロロフェノールは物理化学的性質が他のアルキルフェノール類と異なり, 同時分析が困難であるため本研究の対象から除外した。

B. 研究方法

調査研究は 3 機関で実施した。試験溶液調製法と GC/MS 測定条件は機関によって一部異なる。研究方法及び結果について, 機関により異なる部分については, それぞれ機関名 A, B, C と区別して記載した。

1. 調査対象化学物質

アルキルフェノール 11 種 (4-n-ブチルフェノール, 4-sec-ブチルフェノール, 4-tert-ブチルフェノール, 4-n-ペンチルフェノール, 4-tert-ペンチルフェノール, 4-n-ヘキシルフェノール, 4-n-ヘプチルフェノール, 4-n-オクチルフェノール, 4-tert-オクチル

フェノール, 4-n-ノニルフェノール, 4-ノニルフェノール (混合物, 4-NP と略記)) 及び 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP と略記)。構造式を図 1 に示した。なお, 4-n-ブチルフェノールと 4-tert-ペンチルフェノールはそれぞれ 1 機関と 2 機関で調査対象とした。

2. 調査対象食品

精白米 8 検体, 畜産物 (豚肉, 牛肉, 鶏肉, レバー) 41 検体, 水産物 (近海魚, 養殖魚, 遠洋魚, 養殖カキ) 39 検体, 乳製品 (バター, チーズ, 牛乳) 26 検体, 野菜 (ばれいしょ, ほうれんそう, ブロッコリー, もやし, 大葉) 40 検体, 果実 (りんご, おどろ, いちご) 21 検体, 缶詰 (コーン, ツナ, コンビーフ) 15 検体, 合計 190 検体について, おどろ及び缶詰を除いてそれぞれの品目を 2 機関で調査した。各試料の詳細は表 1~3 に示した。

3. 試薬・試液

有機溶媒: エタノール, メタノール, アセトニトリル, アセトン, ジエチルエーテル, トルエン, シクロヘキサン及びヘキサン (n-ヘキサン) は, 片山化学(株), 和光純薬工業(株)または関東化学(株)製の残留農薬試験用を使用した。

その他の試薬等: 沸騰石は和光純薬工業(株)製の水質分析用またはフナコシ製を, 水酸化カリウムはナカライテスク(株)製の半導体用特性試薬を使用した。

水は住友精密工業(株)製の VOC 測定用水を使用した (機関 A)。食塩水は和光純薬

工業（株）製残留農薬試験用塩化ナトリウムを蒸留水に 10 %となるように溶解後、ヘキサンで3回洗浄した（機関B）。

アルミナは ICN Biomedicals GmbH 製の酸性アルミナ（活性 I）を、硫酸は片山化学(株)製の精密分析用を、無水硫酸ナトリウムは片山化学(株)製の残留農薬試験用を、トリエチルアミンは片山化学(株)製の特級品を、ヘプタフルオ酪酸無水物は和光純薬工業(株)製のガスクロマト(ECD)分析用を用いた。

$^{13}\text{C}_6\text{-HCB}$ は C I L 製をトルエンに溶解して使用した。

10%含水酸性アルミナ：酸性アルミナを 130°C で18時間以上活性化させた後、デシケーター中で放冷し、その 45g に水を加え 50g とした。

0.5mol/L リン酸緩衝液(pH 6)：リン酸二ナトリウム 12 水和物 2.203g 及びリン酸二水素ナトリウム 2 水和物 6.843g を水に溶解し 1000mL とした。

カートリッジカラム：Varian Mega Bond Elut[®] SAX Cartridges (1g/6mL), Waters Sep-Pak[®] Plus C18 Cartridges, Merck KGaA Extrelut[®] NT3 及び Waters Sep-Pak[®] Dry Cartridges を使用した。

標準品：東京化成工業、関東化学、または Dr.Ehrenstorfen GmbH の試薬を用いた。なお、4-ノニルフェノールは東京化成のものを使用した。

標準原液：各フェノール類 10.0mg を 10mL のメスフラスコにとり、アセトンを加えて 10mL とした。

4. 測定条件

機関A

ガスクロマトグラフ：HP5890 Series II (Hewlett[®] Packard 社製)

検出器：5972 Series Mass Selective Detector(Hewlett[®] Packard 社製)

インジェクター：7673 GC/SFC Injector 及び 7673 Controller(Hewlett[®] Packard 社製)

カラム：DB-5MS (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm) (J&W Scientific社製)

ガードカラム：不活性化キャピラリーカラム (内径 0.25 mm, 長さ 1 m)

オープン温度：50°C (1 min)→ 10°C/min → 300°C (4 min)

注入口温度：250 °C

トランスファーライン温度：310°C

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min, 定流量モード)

注入時圧カプログラム：7.7 psi → 99 psi/min → 40 psi (0.1 min) → 99 psi/min → 7.7 psi

イオン化電圧：70 eV

測定モード：SCAN (スキャン範囲: 50-650 amu, スキャンスピード：1.2 scans/sec), SIM (モニターイオンは表 4 参照)

注入量：2 μL (スプリットレス)

機関B

使用機器：HP5890-JEOL DX303 (高感度検出器)

カラム：DB-5MS 及び DB-5.625 (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm)

オープン温度：100 °C(2min)→ 10 °C/min → 280 °C(15min)

注入口温度：280 °C
キャリアーガス：ヘリウム
イオン化電圧：70eV
イオン源温度：250 °C
インターフェース温度：295 °C
測定モード：SIM，モニターイオン
m/z=107, 121, 135, 162, 220, 290
注入量：1 μL (スプリットレス)

機関C

使用機器：HP5890 II - JEOL Automass120
(System II)
カラム：SGE-BPX35 (内径 0.22 mm, 長さ
25 m, 膜厚 0.25 μm) (SGE製)
オープン温度：50 °C (1min) → 10 °C/min
→ 210 °C → 30 °C/min → 300 °C (5min)
注入口温度：280 °C
キャリアーガス：ヘリウム
イオン化電圧：70eV
イオン源温度：210 °C
インターフェース温度：250 °C
測定モード：SCAN (スキャン範囲 50 ~
500 amu)
注入量：1 μL (スプリットレス)

5. 試験溶液調製法

機関A：野菜，果実，白米及びコーン缶詰の試験溶液調製は図2-1に従った。脂肪含量の多い乳製品，肉類，レバーは図2-2の方法に従った。HFBA 誘導体化操作法は図3に従った。

機関B：全試料について図2-1の方法に従った。但し，HFBA 誘導体化は行わず，最終検液量を 10mL とし，内部標準として

¹³C₆-HCB を 50pg 添加した。

機関C：全試料について図2-1の方法に従った。HFBA 誘導体化反応は図3の方法に準じたが，反応はシクロヘキサン中で行った。

6. 定量，確認及び検出限界

機関A：定量はGC/MS (SIM) で行った。図2-1及び2-2に示した方法について操作ブランクを測定してその平均値を定量値から差し引いた。ブランク値の標準偏差の3倍を検出限界とした。操作ブランクが検出されなかったものについては，標準品のS/N=3を検出限界とした。各化合物4本のフラグメントイオンをモニターし，イオン強度比が3つ以上標準品のそれらと一致したものについて測定値を示した。

機関B：定量はGC/MS (SIM) で行った。内部標準を用いて感度補正を行った。4-ノニルフェノールの検出限界は試薬ブランク値から求めた。

機関C：定量はGC/MS (SCAN) で行った。操作ブランクは検出されなかったため，各試料についてS/Nから検出限界を求めた。

C. 研究結果

1. GC/MS測定法の検討

食品中に含まれる低濃度フェノール類の一斉分析にはGC/MSが適しているため，GC/MSによる測定条件を検討した。フェノール化合物を直接GC/MSで測定す

ることも可能であるが、試験溶液のマトリックスの影響を受けやすいため誘導体化後測定を行った。誘導体化にはヘプタフルオロブチル誘導体化を採用した。誘導体化しない場合は、内部標準を添加して感度補正を行った。

各化合物のヘプタフルオロブチル誘導体は、SCANモードに比べてSIMモードでは約10倍高感度に測定できた。

4-NPは各種異性体の混合物であり、GC/MSでは多数のピークが検出された。定量は検出されたピークのうち主な12本のピーク全てまたは感度の良かった2本のみを用いて面積法で行った。

2. 試験溶液調製法の検討

フェノール類の食品試料からの抽出効率を高めるために、アルカリ加水分解後に有機溶媒抽出した。フェノール化合物は動物性食品中にはグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体として含まれている可能性がある。また、蛋白や繊維成分への結合も報告されている。抱合体を含めて分析するためには酸加水分解が有効であるが、フェノール化合物を酸性条件下で加熱すると揮散しやすいため、アルカリ加水分解によって試料からの抽出率を高めた。

確立した試験法に従って代表的な試料に添加回収試験を実施した結果を表5に示した。精白米、牛肉、魚、牡蠣、バター、牛乳、りんご、ほうれんそうに、4-NPを500～1000ng/g、その他のフェノールを10～100ng/g添加したときの回収率は機関Cで

実施したりんごを除いて63～136%であった。揮発性の高い2,4-DCPは相対的に回収率が低かった。ブチルフェノール類とペンチルフェノール類も揮発性が高いため濃縮操作を慎重に行う必要があった。

3. 実態調査結果

市販の各種食品、米8検体、野菜40検体、果実21検体、魚介類39検体、畜肉類41検体、乳製品26検体、缶詰15検体、合計190検体について汚染実態調査を実施した。結果を表6に示した。機関によって試験溶液調製法とGC/MS測定条件が一部異なるので、検出限界が異なるが、検出されるものには共通性が認められた。

最も検出率が高かったのは4-NPであり、肉類から、0.3～180ng/g、魚介類から10～723ng/g、米から9～117ng/g、野菜から4～85ng/g、果実から7～131ng/g、乳製品から4～83ng/g、缶詰から1～127ng/gが検出された。乳製品の中では牛乳では低く、バター、チーズで高かった。畜肉では鶏肉の検出率が高かった。

2,4-DCPが低濃度ながら広範囲の食品から検出された。野菜、果実、バター、チーズ中の濃度が比較的高かった。

検出限界が低い機関Aでは、4-tert-オクチルフェノールが広範囲の試料から検出された。

今回の調査では2,4-DCPと4-NPの検出頻度が高かった。これらは試薬ブランクからも微量ながら検出されることから、広く環境を汚染していることが考えられ、食品

試料の分析にあたって留意する必要があった。試薬ブランクからは他に 4-tert-ブチルフェノール、4-tert-オクチルフェノールが検出された。

D. 考察

1. 4-ノニルフェノールについて

4-NP は動物性食品特に魚介類から頻度高く、また高濃度で検出された。水系環境汚染を反映した結果と推察される。魚種別ではサケ（キングサーモン）で 4-NP の濃度が高い（251 ~ 723ng/g）傾向が認められた。その他の魚種でもタチウオ、タイ等で 180 ~ 450ng/g 検出されており、今後さらに魚介類の汚染調査を継続する必要があると考えられる。

4-NP の log Pow（水・オクタノール分配係数）は 3.28 であるが、魚における半減期は約 20 時間と短く、生物濃縮係数は 40 から 100³⁾ または 13 から 410⁴⁾ であり、生物濃縮性は低いと言われている。また、ヒメダカでの 4-NP とオクチルフェノールの生物濃縮係数はそれぞれ 167, 261 と報告されている⁵⁾。しかし、4-NP の魚と貝における生物濃縮係数は、組織をパンクレアチン酵素で処理してから抽出すると高くなり、それぞれ 1300 と 3400 と報告されている⁶⁾。一方、枝分かれしたアルキル基を持つ 3 種の 4-NP 異性体をニジマスに投与し、胆汁を β -グルクロニダーゼで処理すると 3 つの代謝物が得られ、それらはいずれもそれぞれのアルキル基の ω -1 位が水

酸化された 4-NP であったと報告されている⁷⁾。また、ニジマスにおける 4-NP の主代謝物はノニルフェノールのフェノール性水酸基のグルクロン酸抱合体であると報告されている⁸⁾。

本調査では、アルキルフェノールの水酸化物やグルクロン酸抱合体は分析していない。アルキルフェノール類の水酸化代謝物にも内分泌攪乱作用があることが明らかになった場合には、水産食品及び畜産食品についてはそれらも分析対象に追加する必要がある。また、グルクロン酸抱合体も調査対象に加える必要があると考えられる。

4-NP は食品容器や包装材に由来することも考えられるが、野菜、果実からの検出例では、農薬製剤に展着剤として使用された 4-NP に由来することも考えられる。

2. 2,4-ジクロロフェノールについて

2,4-DCP がいちごから 11 ~ 13ng/g、大葉から 0.9 ~ 17ng/g、もやしから 2.4 ~ 11.2ng/g 検出された。2,4-DCP は農薬の代謝物として存在したかあるいはアルカリ分解によって生成した可能性がある。特に、分子内に 2,4-ジクロロフェノール構造を有する殺虫剤プロチオホス等については、併行して残留実態調査を行う必要がある。

また、2,4-DCP はバター等からも検出されており、2,4-DCP の log Pow は 3.2 であることから、生物濃縮の可能性も考えられる。

今回の調査でアルキルフェノール類との