

図-4 検量線

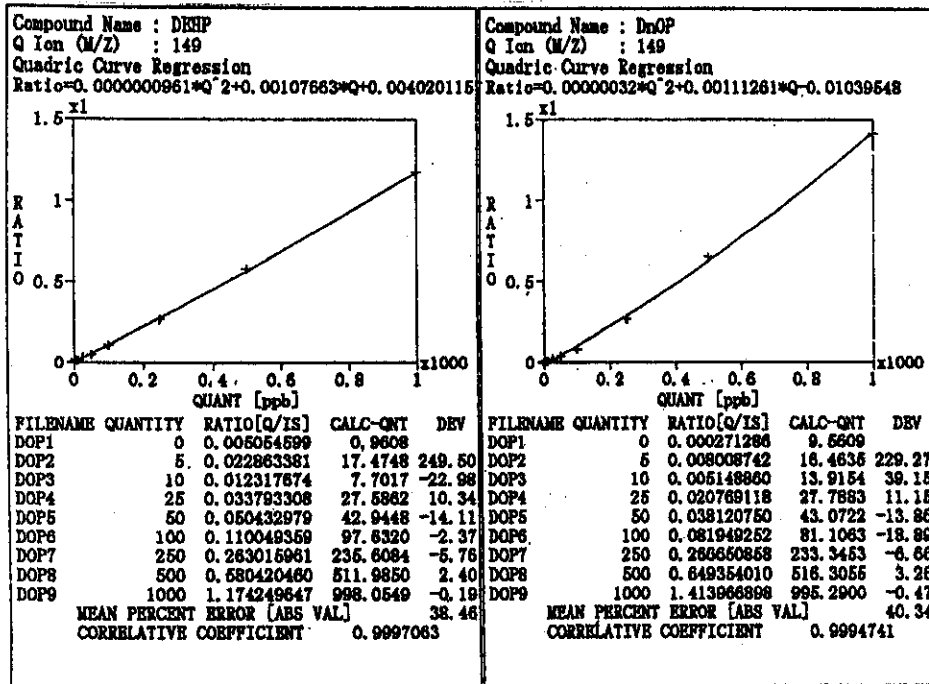
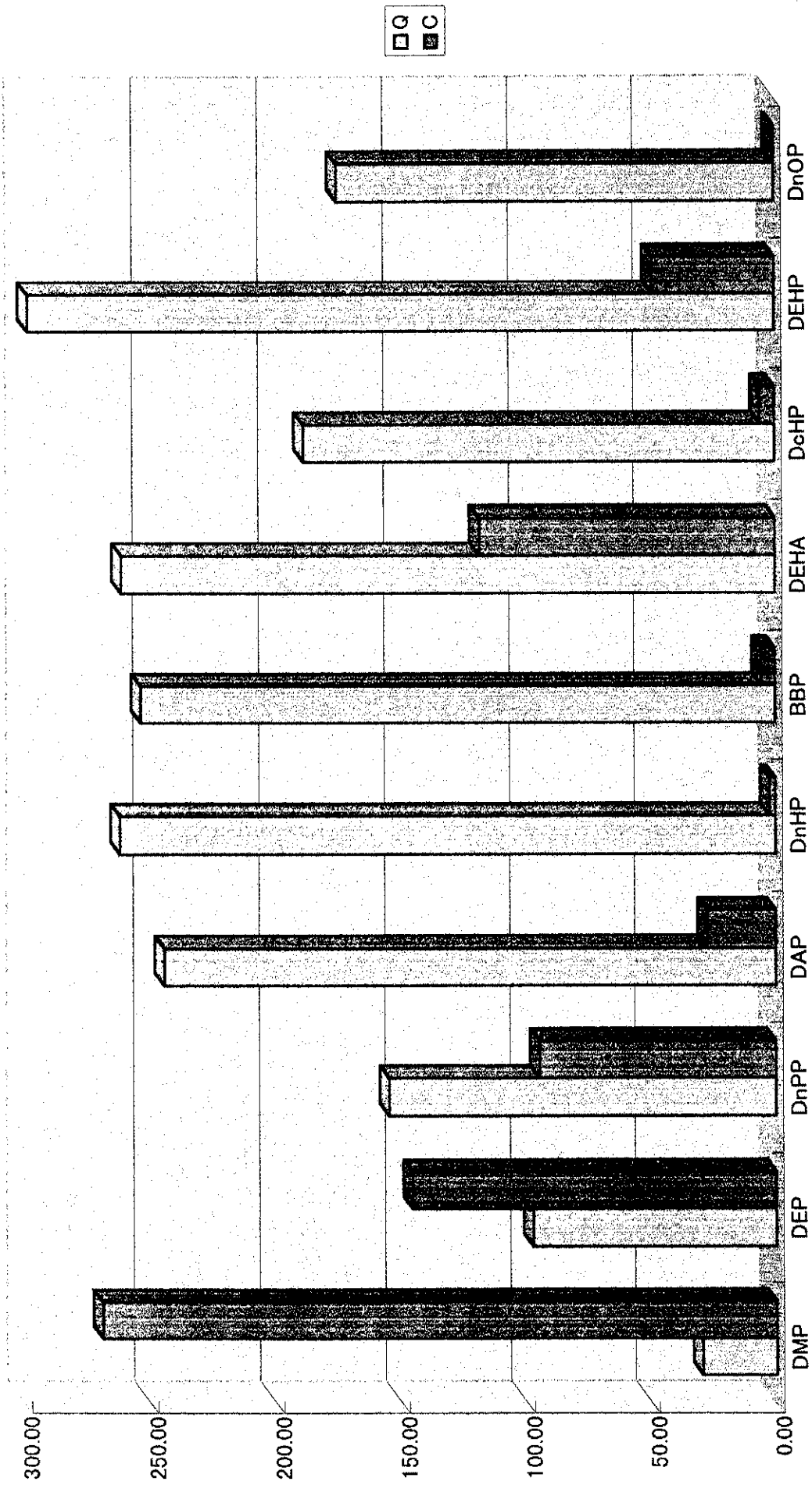


図-4 検量線

図-5 ろ紙の捕捉傾向



高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

－フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析と動態－

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授
研究協力者 牧野 恒久 東海大学 教授

研究要旨

食品の安全性確保の観点から、食品中のフタル酸エステル類等の濃度を把握することは、これら化学物質のリスク評価を行う上で重要であると考えられる。しかし、これら可塑剤、特にフタル酸エステル類は使用量が多く、常に実験室を含む測定環境中に多く存在するため、精度の高い微量分析を困難としている。そこで本研究では、試料の抽出、クリーンアップに精油定量装置を応用した閉鎖系の蒸留システムにより、操作ブランク値の低減化と再現性について検討した。

水を Milli-Q 純粋製造装置（Millipore 社製）で製造した後、8 時間以上、精油定量装置で加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能であった。氷菓に、可塑剤の各標準溶液を 25ppb、100ppb 濃度で添加し、回収試験を行ったところ、絶対検量線法では 45.6～179.0%と大きくばらついたが、内標準法を採用することで 90.2～118.3%と良好な結果を得た。以上のように本法は抽出及びクリーンアップ操作が閉鎖系で行われることで、外部からの汚染を極力抑えた微量分析が可能であり、氷菓、清涼飲料水など、共存物質が少ないと思われる試料の分析には十分適用できることが期待される。

A. 研究目的

フタル酸エステル、アジピン酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチックの可塑剤に使用されている。塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチック製品は、生活用品のみならず、人工腎臓の血液回路、輸血用セット（チューブやバッグ）、カテーテルなど医療器材としても広く使用されている。このように幅広い用途で使用される可塑剤に、内分泌かく乱化学物質としての作用が危惧されている¹⁻²⁾。これらの物質は、プラスチック製容器などから食品

に溶出し、人に摂取される懸念も指摘されていることから、食品中のこれら化学物質の精度の高い分析法を構築することが要求されている。フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析法の報告は、食品中の農薬などの分析法に準じて、液液抽出法や、カラムクロマトグラフィーなど³⁻⁵⁾が用いられている。しかし、フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水、試薬等多岐にわたり、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、精度

の高い分析を困難にしている。

そこで、分析上の障害となるバックグラウンドを極力排除し、高感度定量法を確立するために、抽出・クリーンアップが閉鎖系で行われる精油定量器を用いた蒸留法を検討した。

この装置の基本原理は水蒸気蒸留法に基づくもので、水に不溶性の有機化合物に水蒸気を吹き込み、水蒸気とともに留出してくる揮発性の成分を分離する方法である。

水に不溶性の有機物と水を混ぜ合わせた不均一な混合物が示す蒸気圧 (P_{total}) は、互いに共存する物質の影響を受けないで、有機物 (P_{org}) と水 (P_{water}) の個々の蒸気圧の和になる。この混合物の温度を上げて両者の蒸気圧の和が 1 気圧 (101.325kPa) になれば混合物は沸騰する。

$$P_{total} = P_{org} + P_{water}$$
$$\frac{W_{org}}{W_{water}} = \frac{P_{org} \times (M_{org})}{P_{water} \times (M_{water})}$$

従って、沸点の高い有機物でもある程度の蒸気圧を持っているものは、100℃以下の温度で水蒸気蒸留することができる。

B. 研究方法

B-1 試薬及びフタル酸エステル、アジピン酸エステル標準液

試薬のヘキサン、アセトン、メタノールは関東化学株式会社製のフタル酸測定用溶媒、トルエンは、関東化学株式会社製ダイオキシソキシソ試験用を用いた。無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用 300 を用いた。いずれの溶媒も、GC/MS により妨害ピークを認めないまたはごく少量であるものを用いた。

使用した水はいずれも、本蒸留装置を用い、8 時間以上加熱還流して、揮発性成分を除去し、GC/MS に対して妨害ピークを認めないものを用いた。

フタル酸ジエチル (以下 DEP と略)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA) は関東化学株式会社製環境分析用標準を用いた。内標準物質としては関東化学製環境分析用標準の DEP-d4、DBP-d4、BBP-d4、DEHP-d4、林純薬製 DEHA-d8 を用いた。フタル酸エステル、アジピン酸エステル類を各 1000ng/mL ずつ含むようにヘキサンにて調製し、それを順次希釈して用いた。同様に内標準は各 1000ng/mL ずつ含むように調製し、それを順次希釈して用いた。検量線用標準にはフタル酸エステル、アジピン酸エステル類の溶液に内標準を各 100ng/mL ずつ含むように調製した。

B-2 装置

検出には Hewlett Packard 社製ガスクロマトグラフ質量分析計 (HP5896 /HP5971) を用い、サンプル注入には Hewlett Packard 社製オートサンプラー 7673 を用いた。

蒸留装置 (精油定量器) を Fig.1 に示すように組み立て、ジムロート冷却管の冷却には東京理科機器製 Eyela Cool Ace CA-1110 を用いた。本法で用いるガラス器具類はすべてアセトン洗浄後、200℃の乾燥器内で 4 時間以上加熱したものを用いた。

B-3 GC/MS の分析条件

カラムは J&W 社製 DB-5MS (内径 0.25mm×30m) を用いた。キャリアーガスは He を 0.9mL/min とし、カラム温度は 50℃ から毎分 10℃ で 280℃ まで昇温した。注入口温度は 280℃、検出器温度を 300℃ とした。試料注入量は 1μL とした。検出のモニターイオンには DEP、DBP、BBP、DEHP は $m/z=149$ 、各 d4 体では、 $m/z=153$ 、DEHA、DEHA-d8 は $m/z=129$ 、 $m/z=137$ の SIM で行った。

B-4 蒸留法

内容量 1000mL のナス型フラスコに、8 時間以上還流した水 500mL、試料及び各内標準物質 1000ng/mL のメタノール溶液を 100μL 加え、沸騰ガラス細棒をいれた。精油定量器にトルエンを 1mL 正確に加え、ジムロート冷却器を取り付け、マントルヒーターで加熱蒸留した。蒸留後、トルエン抽出層を小試験管に取り、少量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC/MS 検液とした (Fig. 1)。

B-5 定量操作

各濃度に調整した試料により、GC/MS にてピーク面積を得て、内標準法により検量線を作成した。直線性と再現性、検出限界値を Table 1 に示す。

B-6 プラスチック容器の可塑剤分析

プラスチックフィルム 250mg (9cm²) に対し、アセトン 10mL を 40℃、24h で処理し、GC/MS 試料とした。

C. 研究結果及び考察

C-1 精製水からの可塑剤除去

本法は試料と精製水を加熱還流し、揮発

性成分をトルエンに捕集するため、精製水中に可塑剤が混入していた場合、トルエン中に濃縮され、高いバックグラウンド値として現れてしまうため、サンプル調製前に、用いる水中のこれら可塑剤を除去しなければならない。そこで装置内に精製水を入れ、加熱還流を行った。4 時間蒸留後のトルエンを測定したところ、DBP が 110-455ng/ml (平均 295ng/ml)、DEHP が 120-280ng/ml (平均 200ng/ml) で検出され、測定値の再現性はなかった。さらに蒸留を行ったところ、8 時間の蒸留によってこれら可塑剤は検出されなくなった。それゆえ、精製水中の可塑剤は 8 時間蒸留することで、除去することが可能であると考えられる (Fig. 2)。

C-2 蒸留装置内からの可塑剤の除去

精製水中に含まれる DBP、DEHP は 8 時間蒸留で除去できることが確認されたが、それ以外の可塑剤が装置内に残留することも考えられる。そこで、5 種の可塑剤を 1000ng、装置内に添加し除去を検討した (Fig. 3)。4 時間蒸留後のトルエン中に DEHA、DEHP、DBP、BBP、DEP がそれぞれ 850、850、650、450、250ng 確認された。更に蒸留したところ、8 時間蒸留後のトルエンにこれら可塑剤は確認されなかった。それゆえ DBP、DEHP 以外の可塑剤も蒸留により除去可能であると確認した。

C-3 水への添加回収試験

各可塑剤を 500、100ng/mL 濃度で精製水 4ml に添加して添加回収試験を行った (Table 2)。絶対検量線法による定量分析ではと水溶性の高い DEP、BBP はそれぞれ 45.6%、46.2% と非常に低い回収率で

あり、RSD も 10.8、40.3%と大きくばらついていた。しかしながら、安定同位体を内標準物質として加えることにより 500ng/mL、100ng/mL において 94.5 から 101.3% (RSD \leq 2.9%)、93.7 から 102.5% (RSD \leq 4.3%) と良好な結果を得た。

C-4 清涼飲料水中からの添加回収試験

清涼飲料水 4ml を使用して添加回収試験を行った (Table 3)。各可塑剤を 100、25ng/ml 濃度でそれぞれ 93.5 から 97.3% (RSD=1.5-4.2%)、90.2 から 118.3% (RSD=2.8-5.3%) と良好な結果を得た。本蒸留法によるサンプル中検出限界は DBP と DEHP で 5ng/ml、DEP、BBP、DEHA で 10ng/mL あった (S/N=3)。

C-5 清涼飲料水中の可塑剤の分析

4 種 8 検体について測定した (Table 4)。DBP と DEHP のみが全ての測定試料中から検出され、その濃度範囲は DBP で 5.80 ~ 105.30ng/g、DEHP で 3.30 ~ 36.33ng/g であった。

C-6 包装容器中の可塑剤の分析

清涼飲料水中に確認された DBP、DEHP が容器由来のものであるか確認するため、アセトンにて溶出させ GC/MS 分析を行った。全ての包装容器から DBP、DEHP が確認され、清涼飲料水中で濃度の高かった試料の容器からも同様に高い濃度で検出された (Table 5)。しかしながら、これらの物質が包装容器に可塑剤として使用された場合、10%~50%濃度で用いられると考えられるため、これらは容器製造時、または製品製造時などでの混入と考えられる。

D. 結論

- 1) 精製水を Milli-Q (Millipore 社製) で製造し、さらに 8 時間以上、精油定量装置で加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能であった。
- 2) 氷菓に、可塑剤の各標準を 25ppb、100ppb 濃度で添加し、回収試験を行ったところ、絶対検量線法では 45.6~179.0%と大きくばらついたが、内標準法を用いることで 90.2~118.3%と良好な結果を得た。

以上のように本法は操作が閉鎖系で行われることで外部からの汚染を極力抑えた微量分析が可能であり、氷菓、清涼飲料水など、共存物質が少ないと思われる試料の分析に十分適用できることが期待される。

E. 文献

1. Catherine A.Harris, Pirkko Henttu, Malcolm G. Parker and John p. Sumpter, Environ. Health Perspectives 1997, 105, 802-811
2. E. Mylchreest, R. C. Catteley, P. M. Foster Toxicol. Scie. 1998 43 47-60
3. Matthew Sharman, W. A. Read, L. Castle, J. Gilbert, Food Addit. Contam., 1994, 11 375-385
4. Food Addit. Contam., 1995, 12 129-151
5. Lilian Hammarling, Hakan Gustavsson, Ketti Svensson, Sigbritt Karlsson, Agneta Oskarsson, Food Addit. Contam., 1998, 15 203-208

F. 研究発表（学会発表）

F-1 日本食品衛生学会第78回学術講演会
1999年10月、長野、「食品に混入する内
分泌かく乱化学物質の分析」

F-2 日本内分泌攪乱化学物質学会第二回
研究発表会 1999年12月神戸「高分子素
材に由来する化学物質の分析」

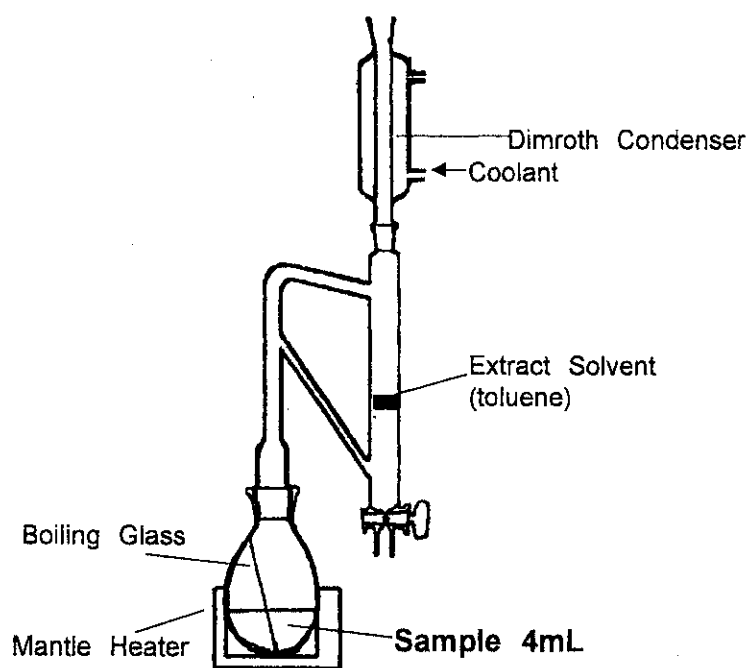


Fig.1 Distillation clean up system

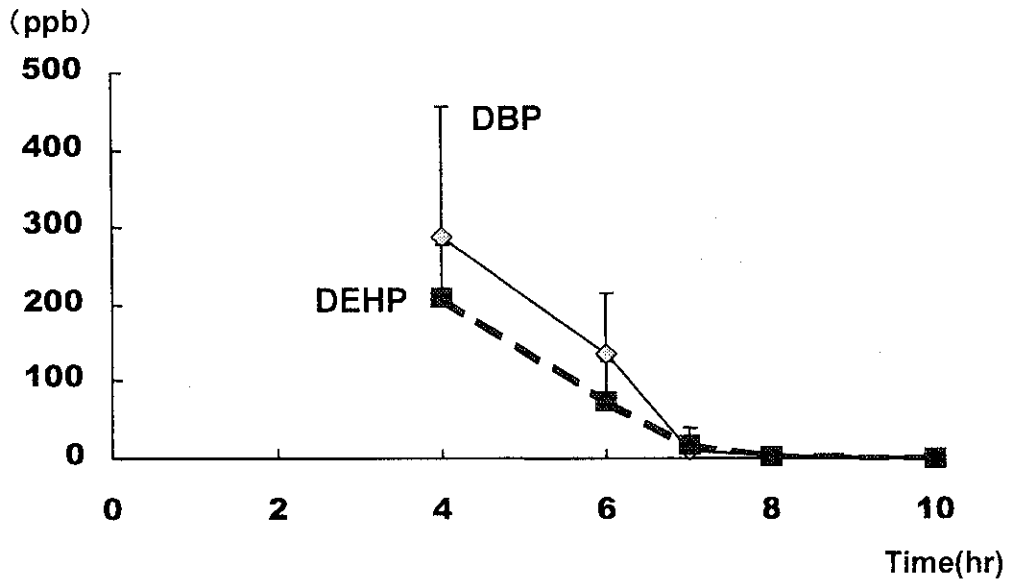


Fig. 2 Removal of plasticizers from the apparatus

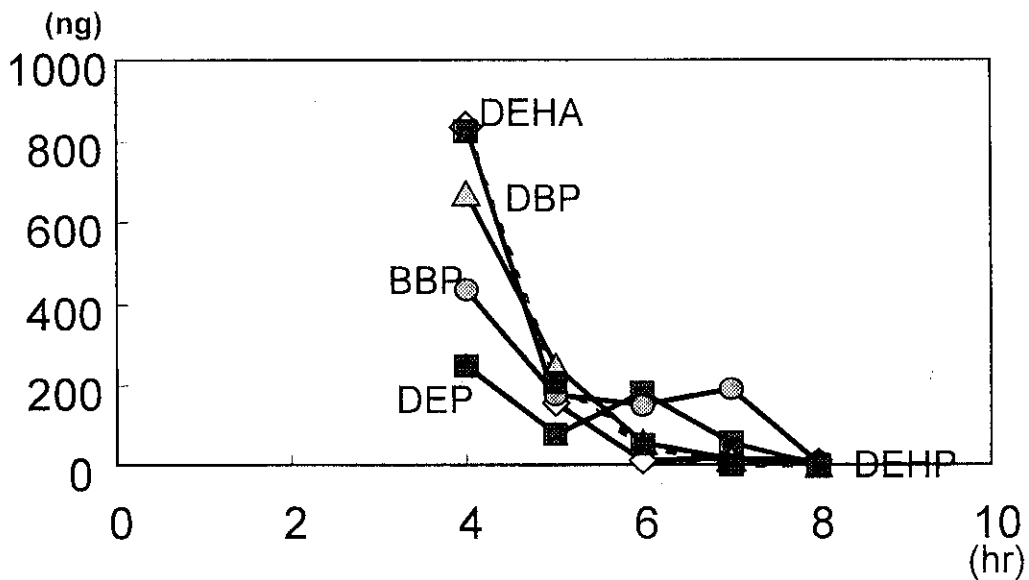


Fig. 3 Spike 1000ng of plasticizers in the apparatus

Table 1 Accuracy data

	DEHA	DEP	DBP	BBP	DEHP
Linearity (ng/mL) (r)	5-1000 (0.998)	5-1000 (0.997)	1-1000 (0.995)	5-1000 (0.998)	5-1000 (0.997)
Detection limit (ng/mL)	2	5	0.5	2	2
Retention time RSD%	0.1	0.08	0.1	0.05	0.08
Peak area RSD% (50ng/mL)	0.3	0.5	1.3	0.9	1.1

Table 2 Recovery test of plasticizers from distilled water

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (RSD%)		
	Without IS 100	With IS 500	With IS 100
DEHA	83.9(13.5)	98.3(0.5)	102.5(1.9)
DEP	45.6(10.8)	94.5(1.1)	93.7(2.8)
DBP	67.4(30.0)	101.3(2.9)	94.4(4.3)
BBP	46.2(33.0)	96.8(1.3)	95.8(1.8)
DEHP	110.5(40.3)	99.8(2.2)	100.3(2.8)

Sample: water 4mL IS 100ng/mL (n=6)

Table 3 Recovery test of plasticizers from beverage

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (RSD%)	
	100	25
DEHA	97.3(2.9)	103.2(3.9)
DEP	93.5(1.5)	90.2(2.8)
DBP	100.3(2.9)	102.4(4.7)
BBP	105.8(4.2)	118.3(5.3)
DEHP	100.8(2.2)	101.3(3.8)

Sample: beverage 4mL IS 100ng/mL (n=4)

Table 4 Analytical results of plasticizers from beverage

Sample	DBP	Found(ng/g)	DEHP
1-a	70.80		25.80
1-b	50.90		22.33
2-a	35.05		18.77
3-a	7.83		3.30
3-b	8.97		4.73
3-c	5.80		6.80
4-a	105.30		29.88
4-b	82.33		36.33

**Table 5 Analytical results of lasticizers
from plastic film for food container**

	Found ($\mu\text{g/g}$)	
	DBP	DEHP
1	9.84	4.82
2	5.40	6.02
3	3.40	2.90
4	10.50	6.50

(n=3)

平成11年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析
——分析注意点及びブランクの扱いについて——

主任研究者 中澤裕之
星薬科大学
研究協力者 松岡 広和、佐久井徳広
横河アナリティカルシステムズ株式会社

研究要旨

外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の微量分析における注意点やブランクの扱いについて、前処理を含め、装置や部品からの影響を把握し、情報を提供する。

A. 研究目的

外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の分析では低濃度での結果を要求されるため、通常分析では注意を払う必要の少ない部分がクローズアップされ、分析結果に影響が現れている。我々分析メーカーでは、前処理もさることながら、少なくとも装置や部品に関してはそれらの影響を把握し、情報を提供しなければならない。今回は今まで行ってきた分析で、注意点やブランクの扱いについて、特に注目度の高い、アルキルフェノール類、芳香族炭化水素類、フタル酸エステル類及びビスフェノールAについての知見を報告する。

B. 研究方法

使用した分析機器及び測定条件はそれぞれ図1.6.9.14.に示した。

C. D. 研究結果及び考察

1. アルキルフェノール類の分析

1-1. 分析での注意点

(1) フラグメントイオンが少なく、分子イオ

ンが出難い化合物が多い。

(2) 定量イオンとして選べるイオン（主に $m/z:107,135$ ）に、マトリックスからの妨害が多く、スキャン分析等で確認が必要である（図.2）。

(3) カラム劣化によるテーリング現象が激しく、カラムを少々切っても簡単には復帰しない。

(4) 誘導体化としてシリル化をする場合、感度は5倍ほどアップするが、*t*-アルキルフェノール類は定量イオンが $m/z:207$ となり、カラムブリードとして検出されるイオンとして、妨害を受けることがある（図3.4.）。

(5) 数十本の異性体ピークの存在（それぞれスペクトルが異なる）により、感度は他のアルキルフェノール類の 1/10 以下であり、 $m/z:135$ で定量する場合、ノニルフェノールでは6本のピークのみとなる。

(6) マトリックスの影響により定量方法の規定が難しい。（ノニルフェノール）

(7) 異性体ピークパターンの扱いが難しい

(ノニルフェノール)。

1-2. ブランク (ノニルフェノール)

- (1) 大気、水及び溶媒においてフタル酸ジブチルやフタル酸2-エチルヘキシルエステルと同様に存在する。また、土壌中にも多く存在しているようである。
- (2) サンプルが飲料水等、数値的に定量限界に近い場合、ブランク水 (リファレンス) との差がなく、扱いが難しい。(ノニルフェノールが検出されない水が手に入らない) (図.5)

2. 芳香族炭化水素類の分析

2-1. 分析上での注意点

- (1) 定量イオンとして選べるイオン (主に4-ニトロトルエン、スチレンダイマーの $m/z:91$, スチレントリマーの $m/z:207$) に、マトリックシヤカラムブリードからの妨害が多い。
- (2) 混合物スタンダードで定量する場合、特にスチレンダイマーで異性体の混合パターンが違ってくることを考慮する (図.7)。

2-2. ブランク

ベンゾフェノン是一部溶媒 (アセトン等) 中に存在しており、スチレンモノマー、ブチルベンゼンは水、溶媒及びゴム製部品類に若干存在する (図.8)。

3. フタル酸エステル類の分析

3-1. 分析上での注意点

$m/z:149$ のイオンはフタル酸エステル独特のものであるが、シリコン製バイアルキャップ等の使用により、シロキサン類のピークによる妨害をうけることがある。また食品中ではスクアレンやセスキテルペン類 (香料等) による妨害を受けることがある。 (図.10)

3-2. ブランク

各所からのコンタミネーションはフタル酸2-エチルヘキシル (DEHP) 及びフタル酸ジブチル (DBP) であり、セプタム等

の部品の表面汚染として、場合によってはフタル酸ジエチル (DEP) やアジピン酸2-エチルヘキシル (DEHA) もある。

- (1) 装置ブランクは、パージ流量のコントロールによりほぼ解消される。
- (2) セプタム等の部品は、表面汚染からのものが多く、焼き出し等によりほぼ解消される。また、部品等が入っている袋等から出し、保存するだけでもブランクの軽減が見られる (図.12.13)。
- (3) 溶媒からの汚染はDBPが殆どで、いまのところ市販の溶媒での回避は難しい (図.11)。
- (4) 前処理中の汚染はDEHPが殆どで、なるべく前処理は簡素化することが望ましい。塩化ナトリウムや無水硫酸ナトリウム中にも存在し、結晶中に取り込まれているようなので、焼いても大きな効果はないようである。また濃縮過程においては、パージガスからの混入及びパージによる飛散があり、検出濃度によっては行わない方が数値が安定する。
- (5) サンプルが飲料水等、数値的に定量限界に近い場合、ブランク水 (リファレンス) との差がなく、扱いが難しい。(特にDEHPが検出されない水が手に入らない)

4. ビスフェノールAの誘導体化 (シリル化) 分析

4-1. 分析の注意点

溶媒の純度、バイアルキャップの材質及び誘導体化試薬の扱い方によっては、シロキサン類のピークが多数検出される。(シロキサン類のイオンは $m/z:355$ に表れるが、同位体イオンとして $m/z:357$ が存在する) (図.15)

4-2. ブランク

誘導体化試薬からのブランクにビスフェノールAの存在が示唆されるがカラムの扱い

(エージング等) 次第によって、この数値が変動する。使用する溶媒に誘導体化試薬を加え分析し、ビスフェノールのピークを確認するとよい(図.16)。

E. 結論

今までの検討で、暗中模索だったブランクの扱いにかなり明かりがさしてきたように思われる。しかし低濃度での分析やブランクの問題を抱えての分析では、分析者の注意力や熟練の差がものを言い、結果に大きな影響を与えることは事実である。我々は、それをサポートするため、今後も新しい知見については情報を提供していくつもりである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

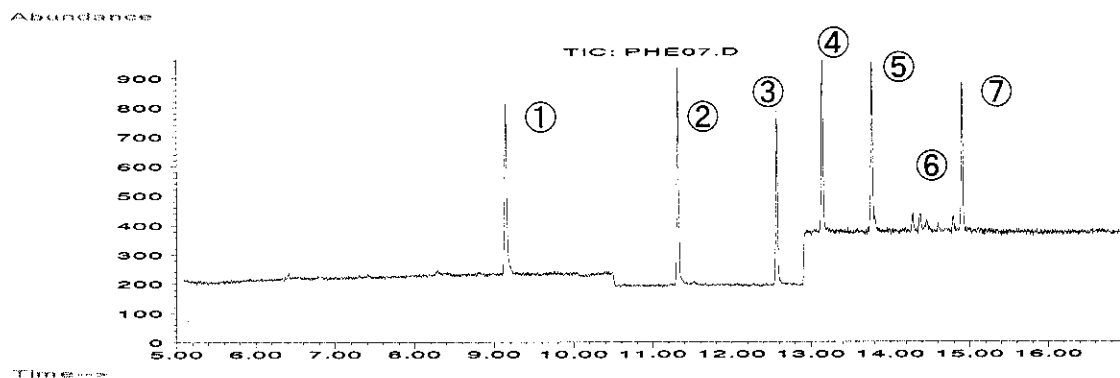
なし

2. 実用新案登録

なし

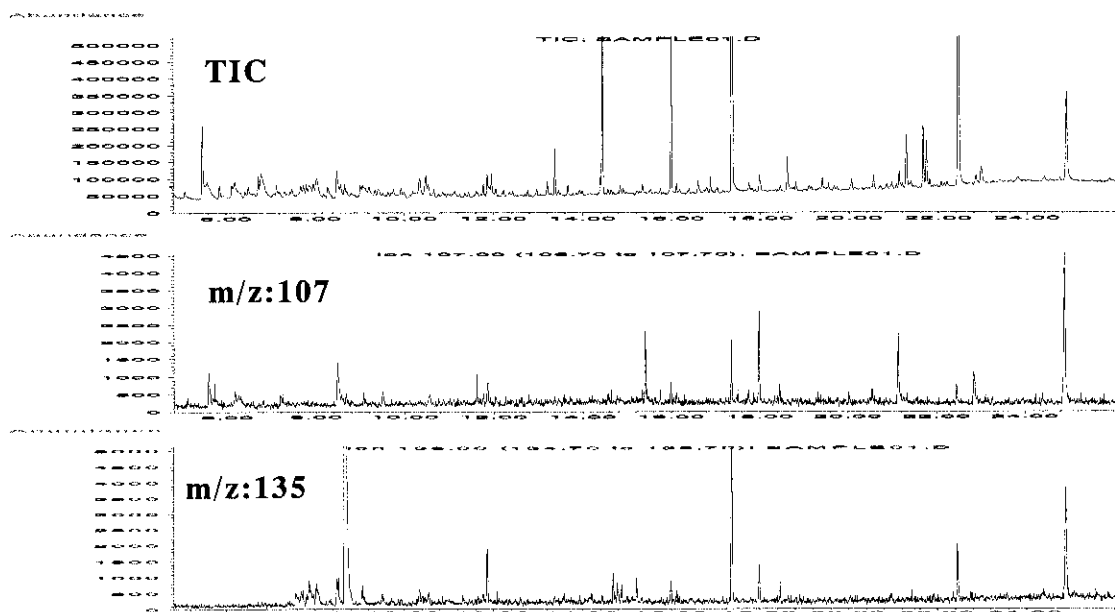
3. その他

なし

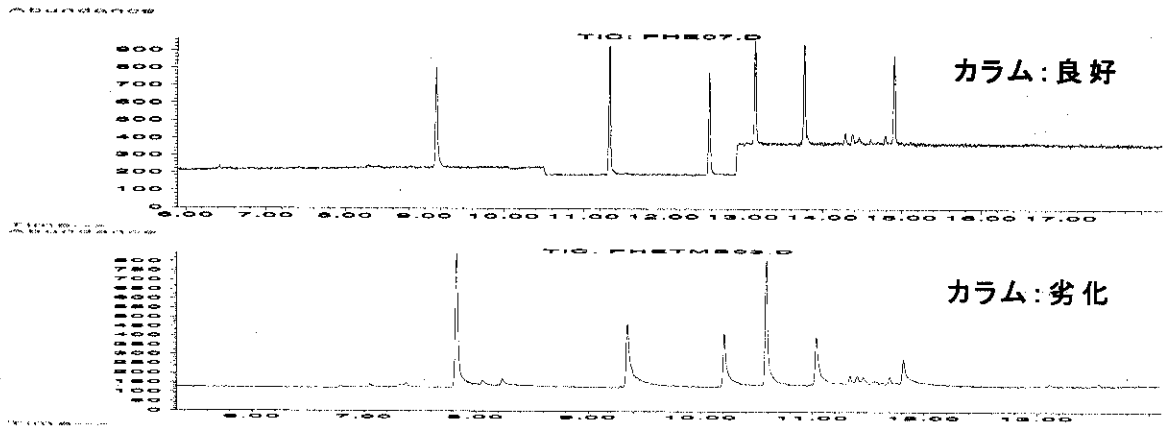


分析条件	化合物名リスト	SIM モニターイオン
カラム: HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25 μm	1. 4-tert-Butylphenol	135 107
注入口温度 : 250°C	2. 4-Pentylphenol	107 164
インターフェース温度 : 280°C	3. 4-Hexylphenol	107 178
オープン温度 :	4. 4-tert-Octylphenol	135 107
60°C(1分)-10°C/分-280°C(5分)	5. 4-Heptylphenol	107 192
イオン源温度 : 230°C	6. Nonylphenol	135 107
	7. 4-Octylphenol	107 206

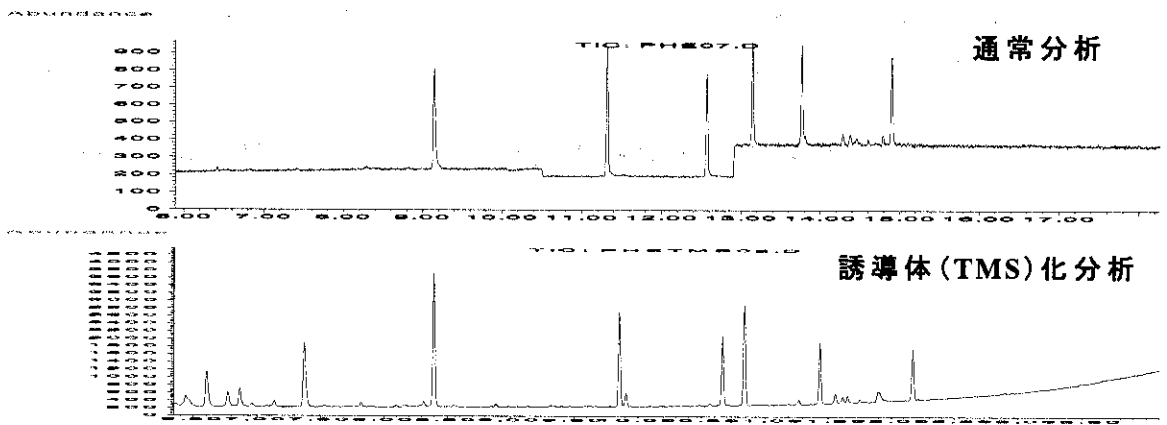
— 図.1 アルキルフェノール類の分析 標準溶液 10ppb —



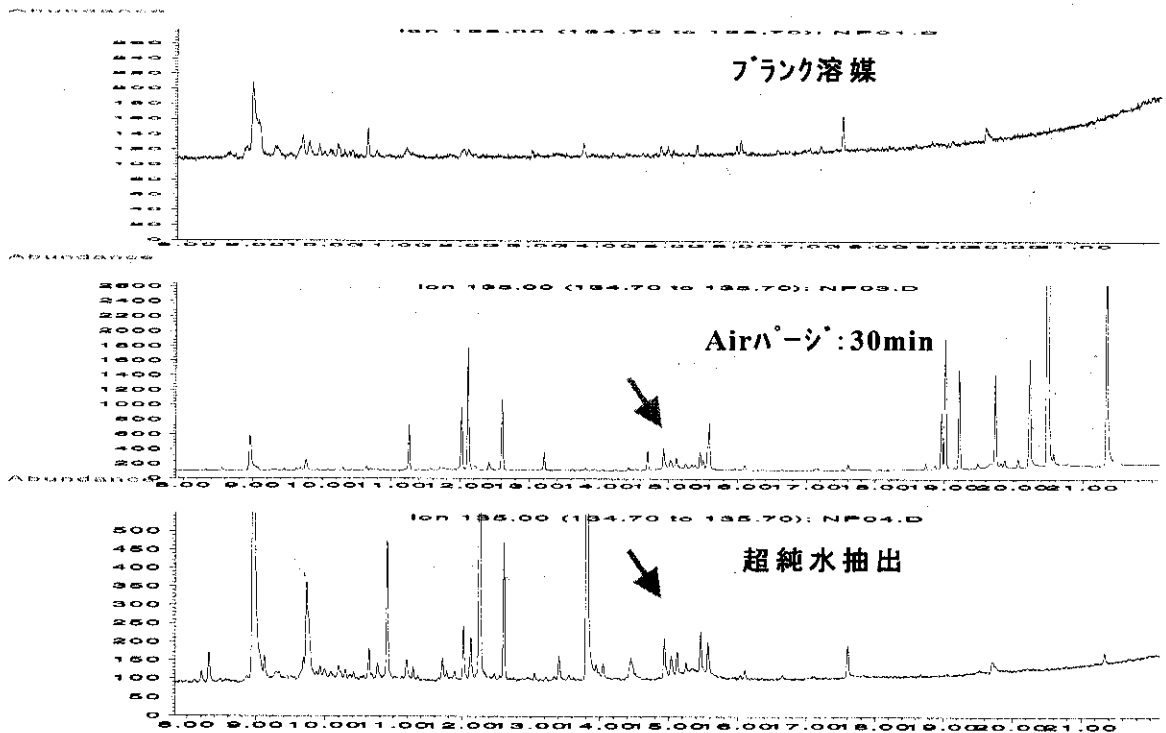
— 図.2 アルキルフェノール類の分析 実サンプルでの妨害イオン —



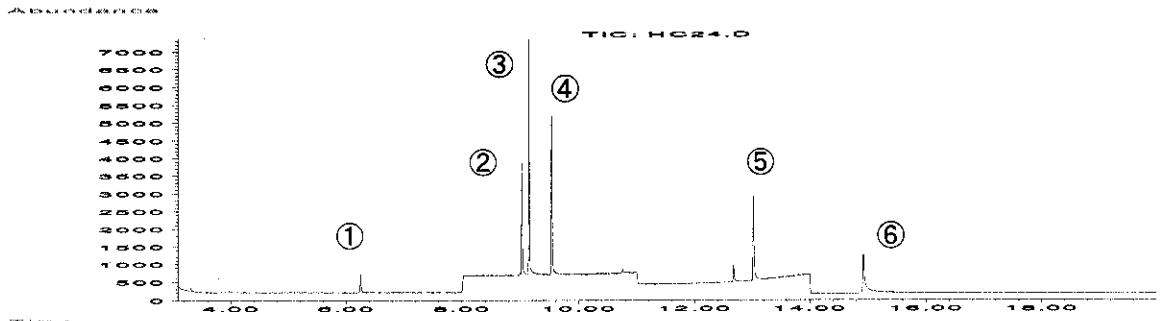
— 図.3 アルキルフェノール類の分析 カラム比較 —



— 図.4 アルキルフェノール類の分析 誘導体化比較 —

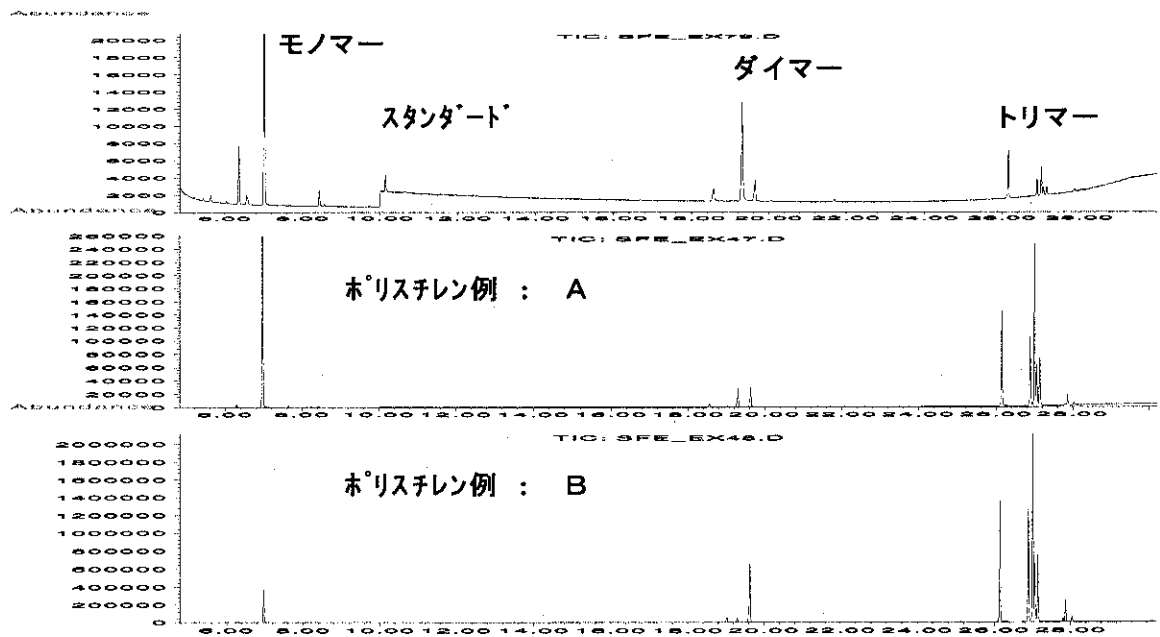


— 図.5 ノニルフェノールのブランク分析 —

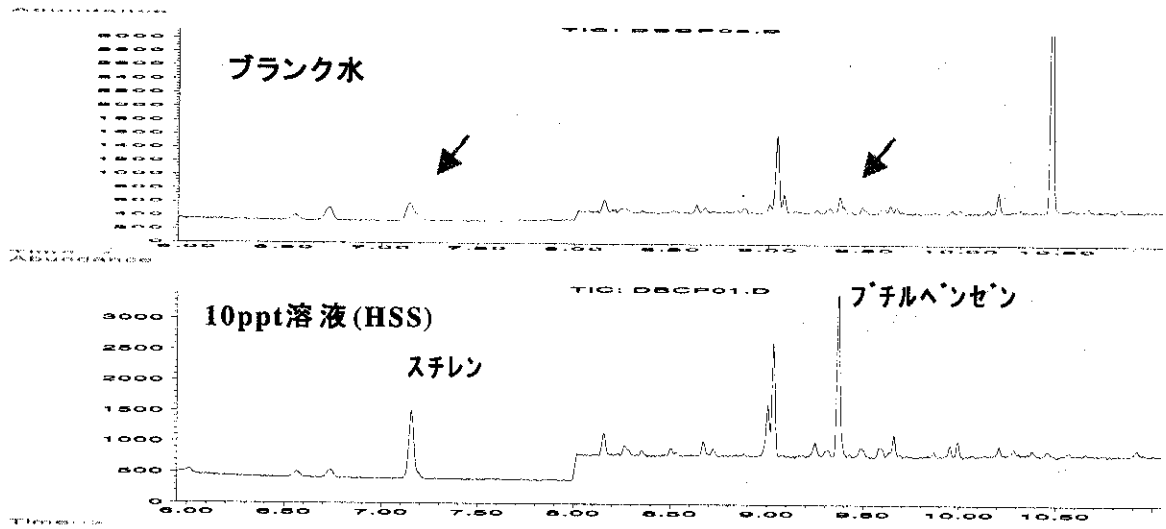


分析条件	化合物名	SIMモニターイオン
GC	1. 4-Nitrotoluene	137 91
カラム: HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25 μm	2. Benzophenone	105 182
オープン温度: 50°C(1分) - 20°C / 分 - 300°C(10分)	3. 1,3-Diphenylpropane	92 196
注入口温度: 250°C	4. 2, 4-Diphenyl-1-butene	91 208
インターフェース温度: 280°C	5. 2, 4, 6-Triphenyl-1-hexene	91 207
イオン源温度: 230°C	6. Benz(a)pyrene	252 250

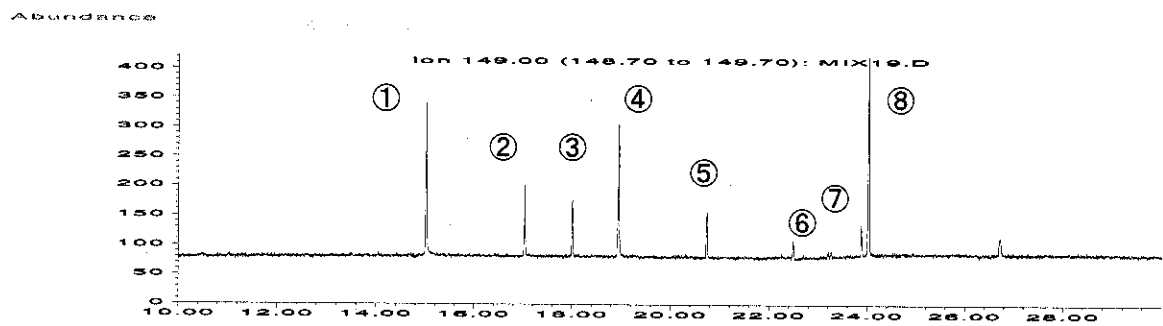
— 図.6 芳香族炭化水素類の分析 標準溶液 1ppb —



— 図.7 スチレンの比較分析 抽出例 —



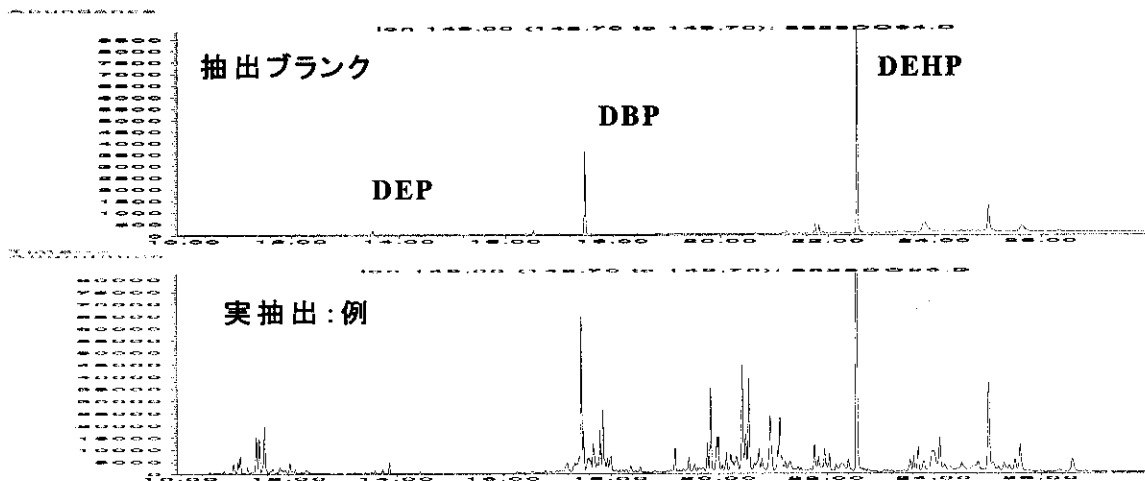
— 図.8 スチレン、フタルベンゼンのブランク分析 —



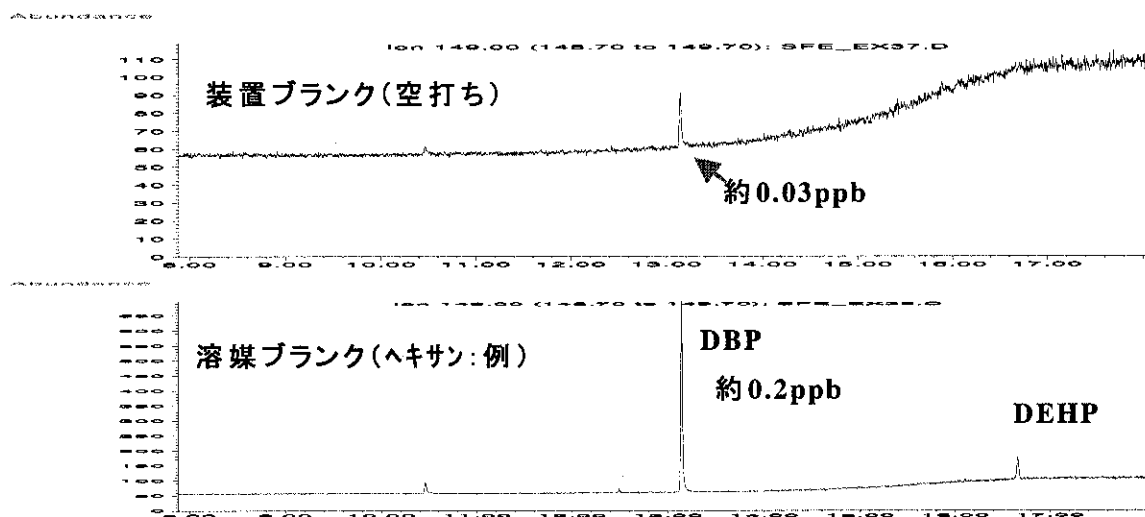
注：①、④、⑧のピーク強度は溶媒からのコンタミネーションのため、正確ではありません

分析条件	化合物名	SIMモニターイオン
GC	1. フタル酸ジエチル (DEP)	149 177
カラム: HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25 μm	2. フタル酸ジプロピル (DPP)	149 209
注入口温度 : 250°C	3. フタル酸ジイソブチル (DIBP)	149 223
インターフェース温度 : 270°C	4. フタル酸ジブチル (DBP)	149 223
オープン温度	5. フタル酸ジペンチル (DAP)	149 237
50°C (2分) - 10°C / 分 - 280°C	6. フタル酸ブチルベンジル (BBP)	149 206
MS	7. フタル酸ジシクロヘキシル (DCP)	149 167
イオン源温度: 230°C	8. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP)	149 167

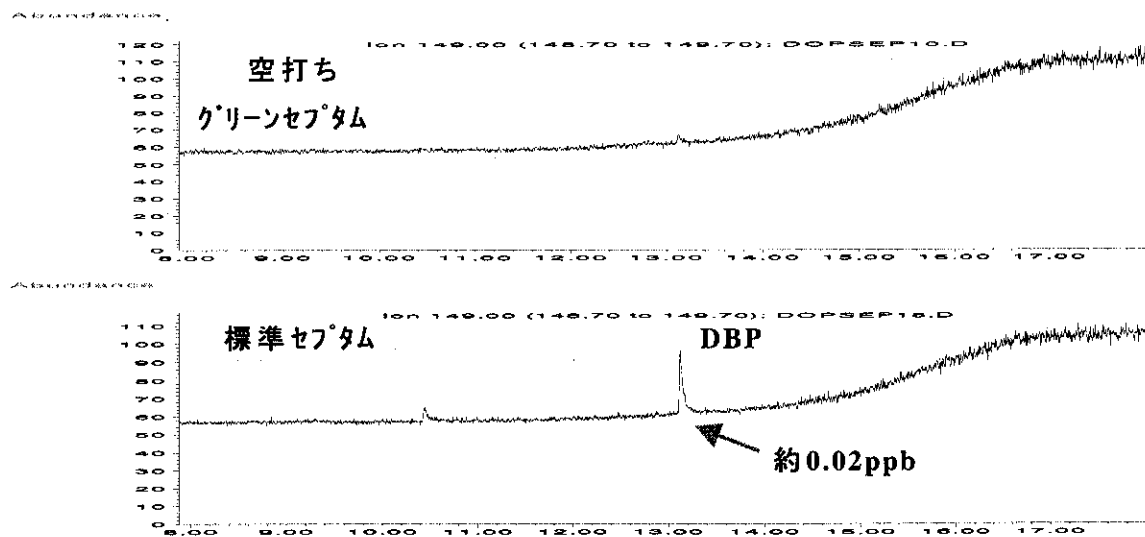
— 図.9 フタル酸エステル類の分析 標準溶液 1ppb —



— 図.10 フタル酸エステル類の分析 抽出例 —



— 図.11 フタル酸エステル類の分析 装置、溶媒からのブランク —



— 図.12 フタル酸エステル類の分析 セプタムからのブランク —