

図4. ヒトchewing によるおしゃぶり玩具試験片からのDINPの溶出分布

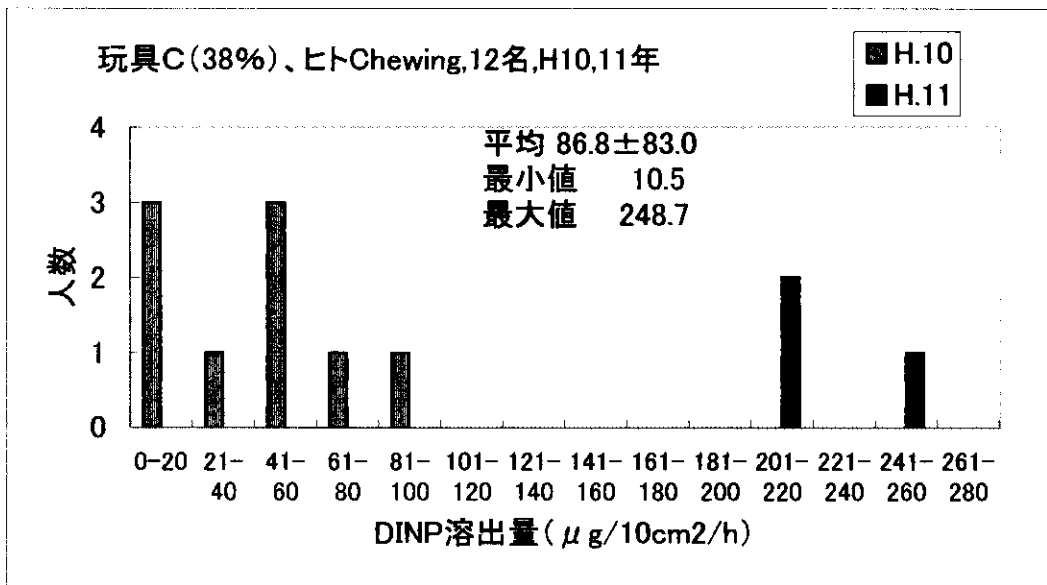


図5. ヒトChewingによるガラガラ試験片からのDINP溶出量の分布

II. 平成 12 年度購入玩具の可塑剤の分析

研究要旨

平成 13 年 1 月に購入した軟質 PVC 製玩具 25 製品 28 検体について、フタル酸エステル等可塑剤の実態調査を行い、平成 10 年度の調査結果と比較した。平成 10 年度に調査した玩具からはフタル酸エステル 5 種類とアジピン酸エステル 1 種類が検出されたが、今回はフタル酸エステル 3 種類 (DINP、DEHP 及び DBP)、アジピン酸エステル 2 種類 (アジピン酸ジ-(2-エチルヘキシル) (DEHA) 及びアジピン酸ジイソノニル (DINA))、クエン酸アセチルトリブチル (ATBC)、トリメリット酸トリ-(2-エチルヘキシル) (TOTM) 及び 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (TMPD) 計 8 種類が認められた。フタル酸エステル類の検出率は 100 % から 63 % に低下し、特に DINP の検出率が 83 % から 52 % に減少した。しかし、DEHP は検出率、含有量ともに前回と差は認められなかった。

A. 研究目的

乳幼児用玩具中のフタル酸エステル類の安全性が社会的問題となったことから、PVC 製品から他の高分子材料への切り替え、可塑剤の変更あるいは添加量の削減等の対応がなされるものと推察された。そこで平成 13 年 1 月に市販製品を購入し、玩具類の材質試験を行い、平成 10 年度の調査結果との比較を行った。

B. 実験方法

1. 試料

2001 年 1 月に玩具店、スーパーマーケット及びデパートで軟質玩具を購入し、その内 PVC 製と判定された玩具 25 製品 28 検体を測定対象とした。これらは、ソフトイ 17 製品、ボール 2 製品、浮き輪 3 製品 6 検体 (本体部と吸い口部に分けて検体とした)、その他 2 製品であった。

2. 試薬

フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、は和光純薬工業 (株) 製、関東化学工業 (株) 製、東京化成工業 (株) 製及びアルドリッチ社製の試薬を用いた。

アセトン、ヘキサン及びアセトニトリルは HPLC 用、片山化学工業 (株) 製を用いた。

トリメリット酸トリス-(2-エチルヘキシル) (TOTM、CASNo.3319-31-1) 及び 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (TMPD、CAS No. 6846-50-0) は東京化成試薬 1 吸を用いた。

3. 標準溶液の調製

フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、TMPD 及び TOTM 50.0 mg はアセトンに溶解して 50 mL とし、1,000 μ g/mL の標準原液を調整後、適宜希釈した。

4. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計：ガスクロマトグラフ HP-5973 NETWORK、質量分析計 HP-6890 SERIES、コンピューター Vectra、Hewlett Packard 社製

5. GC/MS 測定条件

カラム：キャピラリーカラム DB-1(内径 0.25 mm、長さ 5 m、膜厚 0.1 μ m)、J&W Scientific 社製の長さ 30 m のカラムを 5 m に切断したもの

カラム温度：50 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (10 min)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C、インレット温度：280 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：He、3 mL/min (1 psi 定圧)

注入量：1 μ l

イオン化電圧：70 eV、イオン加速電圧：1.9 kV

測定モード：SCAN、スキャンレンジ：40 ~ 700 (m/z)

6. 材質の判別

検体を約 1 cm 角に切り取り、全反射測定装置付きフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) に装着し、赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルを標準品スペクトルと比較し、材質を判別した。

7. 材質試験溶液

PVC 製と判定された検体の一部を細切し、その 0.50 g を量り取り、アセトン 50 mL を加え、マグネチックスターラーで 1 時間攪拌した。室温で一夜放置し、GC/MS 用抽出試験液とし、残存物質の検索、同定、定量を行なった。含有量が多いものについては、この抽出試験液をアセトニトリルで 10 倍あるいは 100 倍に希釈して、定量した。

C. 研究結果

1. 玩具の種類及び表示について

軟質玩具は平成 13 年 1 月に都内のデパート 1 ヶ所、玩具店 2 ヶ所及びスーパーマーケット 1 ヶ所で 29 製品を購入したが、うち 25 製品が PVC 製であった。軟質 PVC 製品の種類はソフトトイ 17 製品、ボール 3 製品、浮き輪 3 製品、その他 2 製品であった。軟質 PVC 製品以外に、オレフィン系エラストマー及び熱可塑性エラストマーと表示されたものが 3 製品あった。そのうち 1 製品は環境ホルモン (外因性内分泌攪乱化学物質) 対策商品と表示されていた。また、疑似食品 2 種類は前回試験対象としたもので、DINP が 36 及び 37 % 検出された。本年度購入した製品に材質表示はなかったが、赤外吸収スペクトルで材質の確認を行ったところスチレン-ブタジエンゴムと判定された。PVC 以外の材質製品はいずれもデパートで販売されていた。

平成 10 年度の玩具製品で材質表示があったのは 68 製品中 6 製品であったが、平成 13 年 1 月に購入した 25 製品のうち 10 製品に表示がなされていた。

2. 玩具中のフタル酸エステル類含有量

25 製品の玩具のうち、浮き輪 3 種類は吸い口部分と本体部に分けて材質試験を行い試験対象は 28 検体とした。軟質 PVC 製玩具から検出されたフタル酸エステルは DINP、DEHP 及び DBP の 3 種類であった。これらのフタル酸エステルは 18 検体から検出され検出率は 62.1 % (表 2)、フタル酸エステル類含有量合計は 22.0 ~ 39.6 %、平均 30.5 % であった。3 種類のフタル酸エステルのうち、最も検出率が高かったのは DINP の 51.7 % であった。DINP の含有量は 0.6 ~ 39.6

%、平均 23.7 %であった。ただし含有量が 1 %を越えた場合（平成 10 年度と同等）の検出率は 44.8 %、平均含有量は 29.4 %となった（表 3）。また、DEHP は 9 検体から検出され、検出率は 32.1 %、含有量は 0.5 ~ 38.7 %、平均 21.4 %であった。含有量が 1 %を越えた場合の検出率は 25.0 %、平均含有量は 27.3 %であった。製品の種類で比べると、ソフトトイ 17 検体からは DINP が 7 検体から 22.6 ~ 35.7 %、DEHP が 1 検体から 30.6 %検出され、いずれも単独で用いられていた。

DBP はボール、浮き輪-1 の本体部及び吸い口部から検出されたが、いずれも 0.07 %以下と少なく、可塑剤として添加したものとは考えにくい。

3. フタル酸エステル以外の可塑剤及び可塑剤総含有量

フタル酸エステル以外の可塑剤は、DEHA、DINA、ATBC、TOTM 及び TMPD の 5 種類が検出された。DEHA、DINA、ATBC 及び TMPD は食品用 PVC 製品の製造に用いる可塑剤のポジティブリストに記載されているものである。しかし、TOTM は記載されてなく、耐熱性があるので電線やフィルムなどに用いられ、また TMPD は一次可塑剤と使用されるものである。

フタル酸エステル以外の可塑剤は 17 検体で検出され、検出率は 60.7 %、含有量は 0.1 ~ 32.5 %、平均 13.9 %であった。検出率はフタル酸エステルの 64.3 %と同程度であったが、含有量平均はフタル酸エステルの半分程度であった。

アジピン酸エステルのうち、DEHA はボール、浮き輪など 6 検体から検出されたが、浮き輪の 2.4 %以外はいずれも

0.11 %以下と低量であった。DINA はソフトトイ 6 製品から 10.6 ~ 20.5 %、ボール-1 から 1.87 %検出され、平均含有量は 11.4 %であった。これら 6 製品はいずれも ATBC と併用されていた。また、製造メーカーはソフトトイ-1 は A 社、それ以外は B 社であった。

ATBC はソフトトイのみ 9 検体から 2.8 ~ 24.3 %検出され、平均含有量は 11.4 %であった。その他に TOTM が浮き輪-2 から 3.5 %、浮き輪-2 の吸い口から 32.5 %検出された。TMPD はソフトトイ、ボール、浮き輪から 0.1 ~ 3.7 %検出され、検出率 28.6 %、平均含有量は 0.8 %と少なかった。

総可塑剤含有量は 18.2 ~ 40.2 %、平均含有量は 28.0 %であった。ボールの含有量は 37.8 ~ 40.2 %とソフトトイに比べて多かった。

4. 平成 10 年度調査結果との比較

フタル酸エステルの検出率は前回 100 %であったのに対して、今回の調査結果では、62 %と減少した（表 4）。特に、DINP の検出率は 82 %から 54 %（含有量 1 %以上の場合 46 %）と低下したが、DEHP の検出率は前回 26 %、今回は 32 %（含有量 1 %以上の場合 25 %）であり大きな変化はなかった。

前回検出された可塑剤はフタル酸エステル 5 種類と DEHA であったが、今回はフタル酸エステル 3 種類、アジピン酸エステル 2 種類の他に ATBC、TOTM 及び TMPD の 8 種類が検出された。また、前回の調査ではソフトトイ 25 検体中 22 検体から DINP が検出され、DINA は検出されていないことから、ソフトトイに使用していた DINP を DINA と ATBC に切り替えたものと考えられた。フタル酸エス

テルから他の可塑剤へ切り替えが進んだことが示されたが、TOTM や TMPD の毒性に関する情報を調べる必要がある。

軟質玩具製品の内、ままごと遊び用の疑似食品玩具は前回 20 製品を入手できたが、今回は 2 製品と少なかった。これら 2 製品は材質表示はなかったものの赤外スペクトルにより、材質はいずれもスチレンブタジエンゴムと判明され、今回 PVC 製疑似食品玩具は入手できなかった。

可塑剤総含有量の平均は 28.0 % で、前回の調査結果 34 % に比べてやや少なくなかった。また前回の調査では 40 % 以上を含有する製品が軟質 PVC58 製品中 12 製品あったが、今回の調査結果で 40 % を越えたのは 1 製品のみと少なかった。

D. 考察

3、4 ヶ月の乳幼児を対象とした歯固めやおさわり玩具の他に人形、疑似玩具の一部が軟質 PVC 以外のオレフィン系エラストマーやスチレンブタジエンゴム等に切り替えられており、一部の玩具メーカーが迅速に対応していることが分かった。また、デパートやスーパーマーケットでは軟質 PVC 製玩具製品が非常に少なくなっており、フタル酸エステルを含有する玩具の販売を規制しようとする配慮が窺われた。玩具協会では平成 12 年 4 月から 3 才未満の乳幼児を対象とした玩具について、材質表示を義務づけており、これに違反したものはなかったが、半分以上の製品に材質表示はなかった。しかし、一部の製品には材質及び可塑剤名の表示も認められた。

フタル酸エステル類の検出率が 62 % に減少したが、これは DINP が DINA 及び ATBC に変更されたもので、DEHP の

検出率はほとんど変化はなかった。

E. 結論

平成 13 年 1 月に購入した軟質 PVC 玩具 25 製品 28 検体について、フタル酸エステル及びその他の可塑剤の実態調査を行ったところ、フタル酸エステル 3 種類 (DINP、DEHP、DBP)、アジピン酸エステル 2 種類 (DEHA、DINA)、ATBC の他に TOTM と TMPD 計 8 種類が検出された。フタル酸エステルの検出率は 62 % であり、平成 10 年度の調査結果 (検出率 100 %) と比較して減少した。特に、DINP の検出率が低下したが、これは ATBC や DINA に変更されたものと推察されたが、DEHP の検出率、含有量は前回と同様の結果であった。

表1. 玩具製品の表示

製 品	生産国	対象年齢	材質表示	購入先	発売元
1 ソフトイー1	中国	3才以上	なし	玩具店1	A
2 ソフトイー2	中国	3才以上	人形本体:ATBC,PVC使用,PAE類は使用していない	デパート	B
3 ソフトイー3	中国	3才以上	人形胴体:オレフィン系エラストマー、 人形頭・ツ:クエン酸系(非フタル酸)PVC、 人形髪:非フタル酸系PVC	デパート	C
4 ソフトイー4	中国	3才以上	PVC,ATBC使用,PAE類は使用していない	デパート	B
5 ソフトイー5	中国	3才以上	なし	玩具店 1	D
6 ソフトイー6	中国	3才以上	なし	玩具店 1	D
7 ソフトイー7	中国	3才以上	なし	玩具店 1	D
8 ソフトイー8	中国	3才以上	PVC,ATBC使用,PAE類は使用していない	玩具店 2	B
9 ソフトイー9	中国	3才以上	PVC,ATBC使用,PAE類は使用していない	玩具店 2	B
10 ソフトイー11	中国	3才以上	なし	玩具店 2	E
11 ソフトイー12	中国	3才以上	なし	玩具店 2	E
12 ソフトイー13	中国	1才以上	軟質PVC	玩具店 2	F
13 ソフトイー14	中国	6か月から	軟質PVC	玩具店 2	F
14 ソフトイー15	なし	6か月から	軟質PVC	玩具店 2	F
15 ソフトイー16	日本	3才以上	PVC,ATBC使用,PAE類は使用していない	デパート	B
16 ソフトイー17	中国	なし	なし	専門店	G
17 ソフトイー18	中国	なし	なし	専門店	G
18 ボールー1	日本	なし	なし	デパート、 玩具店	H
19 ボールー2	なし	なし	なし	玩具店 1	I
20 ボールー3	なし	なし	なし	玩具店 1	J
21 浮き輪ー1	タイ	6才以上	なし	スーパー	K
22 浮き輪ー2	日本	3才以上	PVC	デパート	L
23 浮き輪ー3	中国	3才以上	なし	玩具店 1	D
24 布コーティング	中国	なし	なし	デパート	M
25 バッグ	中国	3才以上	なし	デパート	M

PVC製以外の軟質玩具

1 ソフトイー3	中国	≥ 3 years	人形胴体:オレフィン系エラストマー	デパート	C
2 歯固め	日本	3ヶ月から	本体熱可塑性エラストマー、 クリップABS樹脂	デパート	N
3 おさわり玩具	中国	4ヶ月から	ABS樹脂、熱可塑性エラストマー 環境ホルモン対策商品	デパート	O
4 疑似食品-A	中国	3才~8才	なし	デパート	P
5 疑似食品-B	中国	なし	なし	デパート	P

表2. H.12年度調査対象玩具中のフタル酸エステルの種類及び含有量

検 体	DBP	DEHP	DINP	合 計
ソフトイ - 1				ND
2				ND
3				ND
4				ND
5			30.9	30.9
6			27.4	27.4
7			27.3	27.3
8				ND
9				ND
10			34.4	34.4
11			35.7	35.7
12			22.6	22.6
13			27.5	27.5
14		30.6		30.6
15				ND
16				ND
17				ND
ボール - 1	0.07	0.7	35.1	35.9
2		36.6	2.1	38.7
3		38.7		38.7
浮き輪 - 1	0.01	0.5	26.7	27.2
2		25.5	0.6	26.1
3		10.8	11.2	22.0
吸い口 - 1	0.01		39.6	39.6
2				ND
3			34.1	34.1
布コーティング		23.7	0.9	24.6
バッグ	0.02	25.2		25.2
検出数	4	9	15	18
検出率(%)	14.3	32.1	53.6	64.3
平均含有量(%)		21.4	23.7	30.5
含有量1%以上の検出率(%)		25.0	46.4	
含有量1%以上の平均含有量(%)		27.3	29.4	

表3. 玩具から検出された可塑剤の種類及び含有量(その他)

検体	アジピン酸エステル		その他			小計	可塑剤 合計
	DEHA	DINA	ATBC	TOTM	TMPD		
ソフトイー							
1		20.5	2.8		0.1	23.4	23.4
2		11.5	7.3		0.8	19.6	19.6
3			18.2			18.2	18.2
4		10.6	8.2			18.8	18.8
5						ND	30.9
6						ND	27.4
7						ND	27.3
8		12.4	9.9			22.3	22.3
9		11.9	9.8			21.7	21.7
10						ND	34.4
11						ND	35.7
12					3.7	3.7	26.3
13					0.5	0.5	28.0
14						ND	30.6
15		11.3	8.8			20.1	20.1
16			22.0		0.1	22.1	22.1
17			24.3		0.1	24.4	24.4
ボールー							
1	0.03	1.87				1.9	37.8
2	0.11				1.4	1.5	40.2
3						ND	38.7
浮き輪ー							
1					0.1	0.1	27.3
2	2.4			3.5		5.9	31.9
3	0.02					ND	22.0
吸い口ー							
1						ND	39.6
2	0.02			32.5		32.5	32.5
3						ND	34.1
布コーティング	0.06					0.1	24.7
バッグ						ND	25.2
検出数	6	7	9	2	8	17	28
検出率(%)	21.4	25.0	32.1	7.1	28.6	60.7	100.0
平均含有量(%)	0.4	11.4	12.4	18.0	0.8	13.9	28.0

ATBC: Acetyl tributyl citrate

TOTM: Tri (2-ethylhexyl) trimellitate, 電線、フィルム等に使用

TMPD: 2,2,4-Trimethyl-1,3-Pentanediol diisobutyrate、一次可塑剤として使用される

表4. 軟質PVC製玩具中のフタル酸エステル類及びその他の可塑剤

	1998年10月入手	2001年1月入手
軟質PVC玩具	58 検体	28 検体
フタル酸エステル検出率(%)	100	62 (1%以上含有)
DINP検出率(%)	83	54 (46)
DEHP検出率(%)	26	32 (25)
その他の可塑剤検出率(%)	—	61 (50)
フタル酸エステル種類	DINP, DEHP, DBP DNP, DHP	DINP, DEHP, DBP
アジピン酸エステル種類	DEHA	DEHA, DINA
その他の可塑剤種類		ATBC, TOTM, TMPD
含有量(材質重量当たり)		(平均)
フタル酸エステル類(%)	14~59	22~40 (31)
その他の可塑剤(%)	—	0.1~32.5 (14)
平均含有量(総量)(%)	34	28
	(平均)	(1%以上含有平均)
DINPの含有量(%)	1.5~59 (31)	0.6~39.6 (29)
DEHPの含有量(%)	3.3~38 (21)	0.5~38.7 (27)

ATBC: Acetyl tributyl citrate

TOTM: Tris (2-ethylhexyl) trimellitate, 電線、フィルム等に使用

TMPD: 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate、一次可塑剤として使用される

ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する研究
—フタル酸ジエステル類の唾液中での化学変化—

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学

分担研究者 石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 石橋 亨, 新野 竜大 東京顕微鏡院

研究要旨

本研究は平成11年度の厚生科学研究でのポリ塩化ビニル(PVC)製玩具のヒト chewing 実験により得られた結果に基づき、唾液中のフタル酸モノエステルの分析法、およびヒト唾液中でのフタル酸モノエステルの生成についてそれぞれ試験研究を行った。

I. 唾液中のフタル酸モノエステルのUV検出器付HPLC分析およびGC/MS-SIM分析

唾液中のフタル酸ジエステルおよびそのモノエステル体の抽出は、唾液量と等量のアセトニトリルを加え良く混和した後、遠心分離し、沈殿物を取り除き、アセトニトリルが10%(v/v)になるように0.1%酢酸水溶液を加え、良く混和した。次に、OasisHLB(Waters社製)カートリッジに負荷し、10%メタノール水溶液で洗浄後、10%メタノール・酢酸エチルで溶出した。溶出液を濃縮後、UV検出器付HPLCにてフタル酸モノエステルの分析を行った。移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(60:40)とし、良好な分離能が得られた。

また、フタル酸モノエステルのGC/MS分析は、カルボキシル基をTMSDにてメチルエステル化し、asymmetricなフタル酸ジエステルとした後、GC/MS-SIMにて行った。測定用フラグメントイオンはm/z163, 149および91とした。

II. ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成

5種類のフタル酸ジエステルを、ヒト唾液にそれぞれ100nmol加え、37℃、30分間Incubateし、それぞれのフタル酸ジエステルに相当するモノエステル体をHPLC分析およびGC/MS-SIM分析した。その結果、フタル酸ジエチル(DEP)、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-n-ヘキシル(DHXP)、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)5種類それぞれのフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化により、ジエステル体に相当するモノエステル体がそれぞれフタル酸モノエチル(MEP)21.2%、フタル酸モノブチル(MBP)81.6%、フタル酸モノベンジル(MBenzP)24.6%、フタル酸モノ-n-ヘキシル(MHXP)18.8%、およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)1.8%生成された。

はじめに

乳幼児用ポリ塩化ビニル(PVC)製玩具に含まれる可塑剤のフタル酸ジエステルは、弱いながらもエストロゲン作用を示し、外因性内分泌攪乱化学物質、「いわゆる環境ホルモン」の一つとして疑

われている。また、フタル酸ジエステルのうちフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)およびフタル酸ジイソノニル(DINP)は高濃度で非変異・ガン原性物質であり、動物実験において発ガンプロモーター作用が認められている^{1),2),3)}。

最近この発ガンプロモーターのオカダ酸や TPA が細胞生存数の影響のない低濃度でテストステロン産生を強く抑制することが見出され、発ガンプロモーターと内分泌攪乱作用の関連性が疑われている⁴⁾。このような背景から、フタル酸ジエステルの乳幼児用玩具への可塑剤としての使用を制限する対策が世界各国で講じられている。しかし、合成樹脂製品の可塑剤としてフタル酸ジエステルの使用は広範囲にわたり⁵⁾、現在でも多量に使用されている。

平成 11 年度の本研究では、ヒトの chewing による乳幼児用玩具からのフタル酸ジエステルの口腔内への溶出実験を行った。その結果、一部の玩具からの溶出量が他の玩具からの溶出量と比較し、著しく低いことが分かった。その理由を検討したところ、フタル酸ジエステルが唾液中で化学変化していることが判明した。

そこで本年度における研究は、唾液中のフタル酸モノエステルの分析法、およびフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化によるフタル酸モノエステルの生成について検討を行ったので、以下のように報告する。

I. 唾液中のフタル酸モノエステルの UV 検出器付 HPLC 分析と GC/MS-SIM 分析

II. ヒト唾液中での PAEs の化学変化によるモノエステル体の生成

I. 唾液中のフタル酸モノエステルの UV 検出器付 HPLC 分析および GC/MS-SIM 分析

1. はじめに

唾液中のフタル酸モノエステル 5 種類の UV 検出器付 HPLC 分析と GC/MS-SIM 分析それぞれについて検討した。

2. 実験方法

試薬および器具

標準フタル酸ジエステルおよびモノエステル

- 1) フタル酸ジエチル(DEP)
- 2) フタル酸ジブチル(DBP)
- 3) フタル酸ブチルベンジル(BBP)
- 4) フタル酸ジ-n-ヘキシル(DHXP)
- 5) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)
- 6) フタル酸モノエチル(MEP)
- 7) フタル酸モノブチル(MBP)
- 8) フタル酸モノベンジル(MBenzP)
- 9) フタル酸モノ-n-ヘキシル(MHXP)
- 10) フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)

上記 10 種類の標準試薬のうち、DEP、DBP および DEHP は和光純薬社製でそれぞれの純度が 99.5%以上のものを、MEP は和光純薬社製で純度が 90%以上のものを、BBP は関東化学社製で純度が 98%以上のものを、DHXP および MBenzP は東京化成社製でそれぞれの純度が 98%以上のものを、MHXP、MBP および MEHP は東京化成社製でそれぞれの純度が 90%以上のものをそれぞれ使用した。

上記した標準試薬のうちフタル酸モノエステルそれぞれについて、ジエステル体以外の不純物がないことを薄層クロマトグラフにより確認した。また HPLC および GC/MS それぞれにより、本分析に影響する妨害物質は認められなかった。

アセトニトリル(HPLC 用)、n-ヘキサン(フタル酸エステル・PCB 測定用)、酢酸エチル(残留農薬・PCB測定用)、メタノール(残留農薬・PCB 測定用)それぞれは関東化学社製を、ジメチルスルホキシド(DMSO;生化学用)は和光純薬社製を、トリメチルシリルジアゾメタン(TMSD)は Aldrich 社製をそれぞれ使用した。

フタル酸モノエステル標準溶液：MEP、MBP、MBenzP、MHXP および MEHP の標準品をそれぞれ 100mg 正確に量り、アセトニトリル 100mL で定容したものをそれぞれのフタル酸モノ

ノエステル標準原液(1mg/mL)とした。これをアセトニトリルで希釈し、各種濃度標準溶液を調製した。

フタル酸ジエステル標準溶液：DEP, DBP, BBP, DHXP および DEHP の標準品をそれぞれ 500 μ mol 正確に量り、DMSO に溶かし 10mL にそれぞれ定容した。これをフタル酸ジエステル標準原液(50 μ mol/mL)とした。さらにこの標準原液を DMSO で希釈し、各濃度標準溶液を調製した。

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 0.3g, および尿素 0.2g をそれぞれ蒸留水に溶かし、0.1N 水酸化ナトリウムで pH7.0 に調整し、全量を 1000mL とした。

ミニカラム OASIS HLB(3cc) : Waters 社製, 使用前に酢酸エチル 5mL, メタノール 5mL および 0.5%酢酸水溶液 10mL で洗浄した。

本実験に使用した試薬はすべてフタル酸ジエステルが含まれていないことを確認した。また、実験に使用したガラス器具は使用前に 230℃で 5 時間加熱処理した。

装置

UV 検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) : LC-10A, 島津製作所社製

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS) : GCMS-QP5050, 島津製作所社製

HPLC 分析条件

カラム : Inertsil C8-3(4.6 \times 250mm), カラム温度 : 40℃, 移動相 : アセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(6:2), 流速 : 1.0mL/分, 検出器 : UV(検出波長 254nm), 注入量 : 10 μ L

GC/MS 分析条件

GC 部

カラム : CBP5(30m \times 0.25mm i.d., 0.25 μ m), カラム温度 : 初期温度 100℃(1 分保持) \rightarrow 昇温 10℃/分 \rightarrow 最終温度 270℃, 注入口温度 : 260℃, インターフェース温度 : 260℃

MS 部

イオン化法 : EI 法, イオン化電圧 : 70eV, イオン源温度 290℃, 検出モード : SIM, フタル酸モノエステル測定用イオン[®] : m/z163, m/z149 および m/z91, フタル酸ジエステル測定用イオン : m/z149, 確認用イオン : m/z177(DEP), m/z223(DBP), m/z206(BBP), m/z251(DHXP), m/z167(DEHP)

唾液中のフタル酸モノエステルの測定

フタル酸ジエステルを含まないポリプロピレン製試験片を成人被験者の口腔内に入れ、chewing し、口腔内に溜まった唾液を採取した。採取は昼食前の空腹時に行った。採取した唾液 15mL に人工唾液(pH7.0)5mL を加え、混合し、本実験の唾液とした。その唾液 3mL を 50mL ネジ蓋付遠心分離管に入れ、0.1NHCl にて唾液を約 pH4 に調整し、アセトニトリルを 1mL 加え、振とう抽出した。つぎに、3000r.p.m., 5 分間遠心分離し、沈殿物を取り除き、アセトニトリル濃度が約 10%になるよう 0.5%酢酸水溶液を 16mL 加え、よく混和し、これを精製用試験液とした。これをミニカラムの OASIS HLB に負荷し、メタノール・水(1:9)5mL で洗浄後、メタノール・酢酸エチル(1:9)10mL でフタル酸モノエステルを溶出した。溶出液を窒素気流下濃縮・乾固し、アセトニトリルを 2mL 加えフタル酸モノエステル測定用試験液とした。

上記の試験液 1mL を 10mL 容試験管にとり、窒素ガスで溶媒を留去し、酢酸エチル、メタノールおよび TMSD をそれぞれ 500, 100 および 30 μ L 加え、室温で 30 分間メチルエステル化した。反応後、窒素ガスを通気して溶媒を留去し、n-ヘキサンを加え、GC/MS 分析用試験液とした。これを GC/MS-SIM で、フタル酸ジエステルおよびメチルエステル化フタル酸モノエステルをそれぞれ測定した。

3. 研究結果および考察

HPLC の分析条件

フタル酸モノエステル(図 I-1)は分子中に遊離

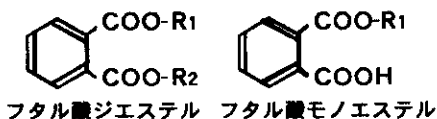


図1-1 フタル酸ジエステルおよび
フタル酸モノエステルの構造式
R₁とR₂:アルキル基
R₁=R₂は対象(symmetric)なフタル酸
ジエステル
R₁≠R₂は非対象(asymmetric)なフタル
酸ジエステル

のカルボキシル基を持つ酸性物質である。平成11年度における本研究で、フタル酸モノエステルとして、MBPとMEHPの2種類のHPLC分析条件を設定した。本年度は上記2種にMEP, MBenzP, MHXPの3種を加えた計5種類のフタル酸モノエステルのHPLCによる一斉分析条件について検討した。

HPLCの分析用カラムは平成11年度と同様、逆相系のC8カラムを使用した。また移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(8:2)を用いた。UV検出器の検出波長は254nmとした。その結果、ピーク形状の良好なクロマトグラムが得られたが、MEP, MBPおよびMBenzPの分離が悪く、良好な分析条件ではなかった。そこで、移動相のアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液の比率を6:4としたところ、図I-2に示すように分離能の良好な5本のピークが得られた。また、これら5種類のモノエステル体はそれぞれ0.1~100 μg/mLで原点を通る直線性を示した。

そこで本実験でのMEP, MBP, MHXP, MEHPおよびMBenzPのUV検出器付HPLCによる一斉分析では、移動相にアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(6:4)を用いた。

GC/MSによるモノエステル体の分析

フタル酸モノエステルは分子中に遊離のカルボキシル基を有し、GC分析ではこの基を誘導体化しなければ分析が困難である。そこで、本研究では平成11年度の研究結果と同様、5種類のフタル酸モノエステルそれぞれのカルボキシル基をメチルエステル化し、微極性カラムCBP5での昇温分析によるGC/MS分析を行った。メチルエステル化剤は、ジアゾメタンの毒性や爆

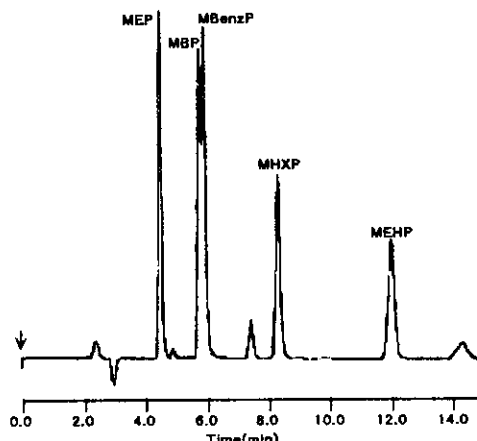


図1-2 フタル酸モノエステルのHPLCクロマトグラム
フタル酸モノエステル:各々100ng
MEP:フタル酸モノエチル,MBenzP:フタル酸モノベンジル
MBP:フタル酸モノブチル,MHXP:フタル酸モノ-n-ヘキシル
MEHP:フタル酸モノ-n-オクタヒル

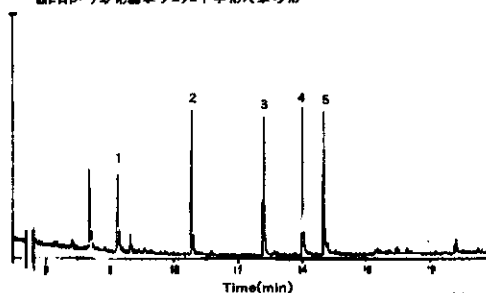


図1-3 メチルエステル化フタル酸モノエステルの総イオンクロマトグラム

メチルエステル化フタル酸モノエステル:各々1ng
1:メチルエステル化フタル酸モノエチル(Methyl-MEP)
2:メチルエステル化フタル酸モノブチル(Methyl-MBP)
3:メチルエステル化フタル酸モノ-n-ヘキシル(Methyl-MHXP)
4:メチルエステル化フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(Methyl-MEHP)
5:メチルエステル化フタル酸モノベンジル(Methyl-MBenzP)

発性を少なくした取り扱いの容易なメチル化剤であるTMSDを用いた。TMSDによるメチルエステル化はHashimoto⁹⁾らの方法を応用した。

それぞれのメチルエステル化されたフタル酸モノエステルをEI法によりGC/MS分析した。得られた総イオンクロマトグラム(TIC)を図I-3に、そのマススペクトログラムを図I-4, 5および6に、またメチルエステル化されたフタル酸モノエステルそれぞれの保持時間と特徴的なフラグメントイオンを表I-1にそれぞれ示した。

5種類のフタル酸モノエステルは微極性キャピラリーカラムでのGC分析においてそれぞれ分離良好な5本のピークが得られ、それぞれのカルボキシル基がTMSDによりメチルエステル化され、asymmetricなフタル酸ジエステルが生成された。また生成されたメチルエステル化MEP, MBP, MHXPおよびMEHPは、EI法によるGC/MS分析でm/z163([C₆H₄(COOCH₃)CO]⁺)

と $m/z149$ ($[C_6H_4(CO)_2OH]^+$) にそれぞれ選択性の高いフラグメントイオンが認められた。その相対強度は $m/z163$ を 100%としたとき、 $m/z149$ のそれはメチルエステル化 MEP, MBP, MHXP および MEHP がそれぞれ 59%, 80%, 89% および 63% であった。また、メチルエステル化 MBenzP は $m/z163$ と $m/z149$ のフラグメントイオンが認められ、さらに $m/z91$ ($[C_6H_5CH_2]^+$) の特徴的なフラグメントイオンが認められた(図 I-5)。一般に、フラグメントイオン $m/z149$ と $m/z163$ は EI 法による GC/MS 分析での symmetric なフタル酸ジエステルの特徴的なフラグメントイオンである⁷⁾。また、それぞれの親イオン(M^+)の相対強度はメチルエステル化 MEP, MBP, MHXP, MEHP および MBenzP が 2.3%, 0.7%, 0.8%, 0.5% および 1.4% と非常に小さく、これらのイオンを確認することが困難であった。

そこで、本実験での MEP, MBP, MHXP, MEHP および MBenzP の GC/MS 分析では、それぞれのカルボキシル基を TMSD にてメチルエステル化し、それぞれから得られた $m/z163$, $m/z149$ および $m/z91$ のフラグメントイオンを SIM モードにて測定することにより、5 種類それぞれのフタル酸モノエステルを分別・定量することが可能となった。その SIM クロマトグラムを図 I-7 に示した。

また、本法による GC/MS 分析において、symmetric なフタル酸ジエステルである DMP, DEP, DBP, DHXP, DEHP および BBP は、今回測定対象とした 5 種類の asymmetric なメチルエステル化フタル酸モノエステルとそれぞれ異なる保持時間を示した。そこで symmetric なフタル酸ジエステルに特徴的なフラグメントイオンである $m/z149$ ⁸⁾ を SIM することで、メチルエステル化フタル酸モノエステルと同時に symmetric なフタル酸ジエステルを分別・定量することが可能となった。

唾液中のフタル酸モノエステルの分析法

唾液中のフタル酸モノエステルはフタル酸ジ

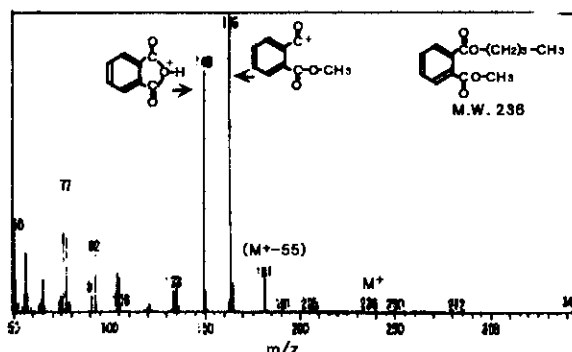


図 I-4 メチルエステル化フタル酸モノブチルのマススペクトログラム

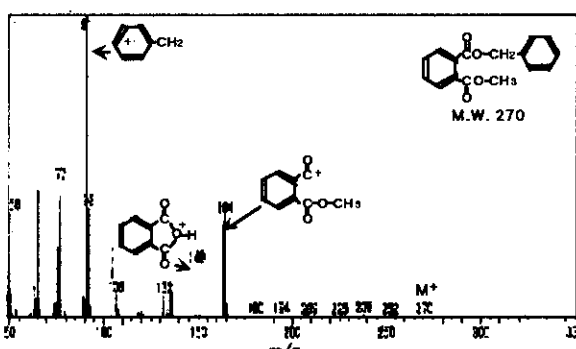


図 I-5 メチルエステル化フタル酸モノベンジルのマススペクトログラム

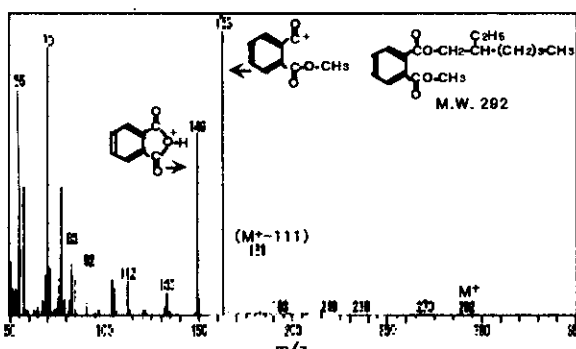


図 I-6 メチルエステル化フタル酸モノ-2-エチルヘキシルのマススペクトログラム

表 I-1 GC/MS によるメチルエステル化フタル酸モノエステルの保持時間と特徴的なフラグメントイオン

M.W.	R.T. (min)	Fragment ions (m/z) (relative intensity, %)	M^+
Methyl-MEP	8.2	149(59) ^{a)} 163(100) ^{a)} 178(18)	208(2.3)
Methyl-MBP	10.6	149(80) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(17)	236(0.7)
Methyl-MHXP	12.8	149(89) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(27)	264(0.8)
Methyl-MEHP	14.1	149(83) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(31)	292(0.5)
Methyl-MBenzP	14.7	91(100) ^{a)} 163(31) ^{a)} 149(17)	270(1.4)

a): 測定用イオン

Methyl-MEP: メチルエステル化フタル酸モノエチル

Methyl-MBP: メチルエステル化フタル酸モノブチル

Methyl-MHXP: メチルエステル化フタル酸モノヘキシル

Methyl-MEHP: メチルエステル化フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

Methyl-MBenzP: メチルエステル化フタル酸モノベンジル

エステルの抽出法に準じ、アセトニトリル抽出を行った。唾液に 5 種類のフタル酸モノエステルを 50ng 加え、等量のアセトニトリルで抽出

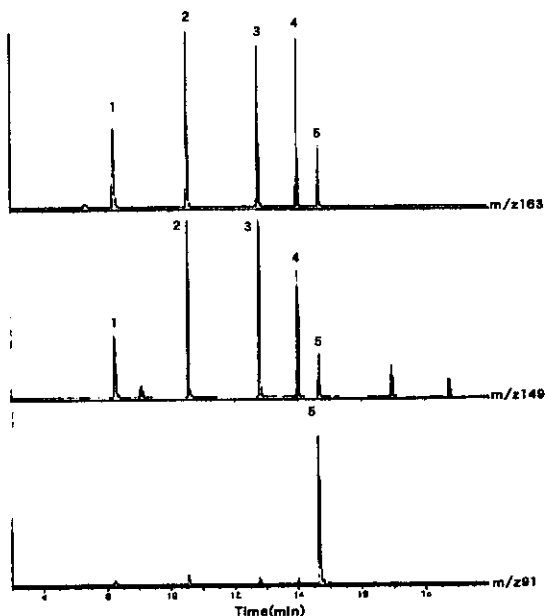


図1-7 メチルエステル化フタル酸モノエステルのGC/MS-SIMクロマトグラム

メチルエステル化フタル酸モノエステル：各々10ng
 モニターイオン：m/z163, 149, 91
 1:メチルエステル化フタル酸モノエチル(Methyl-MEP)
 2:メチルエステル化フタル酸モノブチル(Methyl-MBP)
 3:メチルエステル化フタル酸-n-ヘキシル(Methyl-MHXP)
 4:メチルエステル化フタル酸-2-エチルヘキシル(Methyl-MEHP)
 5:メチルエステル化フタル酸モノベンジル(Methyl-MBenzP)

し直接 HPLC 分析した。その HPLC クロマトグラムを図 I-8 に示した。それぞれのフタル酸モノエステルの回収率は 91%以上であった。しかし、唾液由来のピークが数多く出現したため、ミニカラムによる精製・濃縮法について検討した。

モノエステル体は酸性物質であるため、0.1NHCl で唾液を約 pH4 に調整し、等量のアセトニトリルを加え、振とう抽出した。得られた抽出液を 3000r.p.m., 5 分間遠心分離し沈殿物を取り除き、アセトニトリル濃度が 10%になるよう 0.5%酢酸水溶液を加え、よく混和した。これを精製用試験液とした。

ミニカラムによる精製は逆相系固相抽出ミニカラムの C18 および OASIS HLB それぞれについて検討した。精製用試験液をそれぞれのミニカラムに負荷し、メタノール・水(1:9) で洗浄し、メタノール・酢酸エチル(1:9)でフタル酸モノエステルを溶出した。C18 および OASIS HLB でのフタル酸モノエステルの回収率はそれぞれ 94%以上および 97%以上であり、若干ではあるが OASIS HLB の回収率が良好であった。一方、

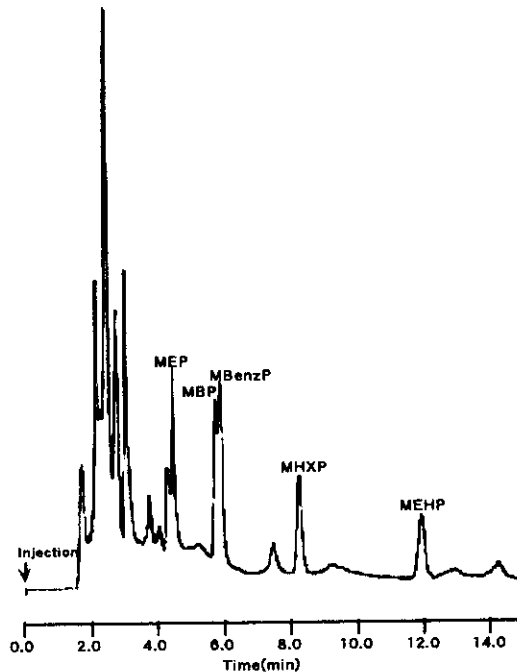


図1-8 唾液に添加したフタル酸モノエステルのHPLCクロマトグラム

フタル酸モノエステル：各々50ng添加
 MEP:フタル酸モノエチル,MBenzP:フタル酸モノベンジル
 MBP:フタル酸モノブチル,MHXP:フタル酸モノ-n-ヘキシル
 MEHP:フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

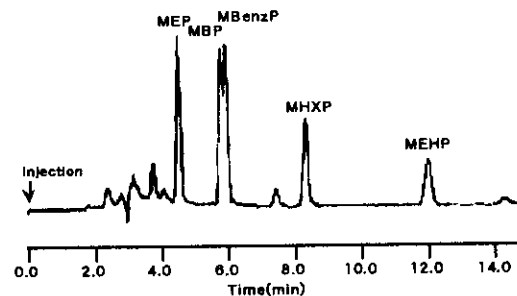


図1-9 唾液に添加したフタル酸モノエステルをOasis

ミニカラムにより精製した後のHPLCクロマトグラム
 フタル酸モノエステル：各々50ng添加
 MEP:フタル酸モノエチル,MBenzP:フタル酸モノベンジル
 MBP:フタル酸モノブチル,MHXP:フタル酸モノ-n-ヘキシル
 MEHP:フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

精製効果は両者とも良好であった。よって、本法では OASIS HLB の固相抽出カートリッジを使用した。

また、唾液にフタル酸モノエステル 5 種類をそれぞれ 50ng 添加し、本法全体を通して添加回収試験を行った。その結果、それぞれの回収率は 94%以上であり、精製効果も良好であった。その HPLC クロマトグラムを図 I-9 に示した。

以上により本実験では、唾液を酸性にし、アセトニトリル抽出し、Oasis HLB で精製・濃縮後、HPLC 分析した。唾液中のフタル酸モノエ

ステルを TMSD にてメチルエステル化し、GC/MS-SIM 分析した。

4. まとめ

1) 5 種類 of フタル酸モノエステル(MEP, MBP, MBenzP, MHXP および MEHP)の HPLC 分析条件は、カラムが逆相系 C8 カラム、移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(6:4)のアイソクラティック分析、UV 検出器の検出波長 254nm とした。

2) GC/MS によるフタル酸モノエステルの確認は TMSD でカルボキシル基をメチルエステル化し、測定モード SIM にて m/z163, m/z91 および m/z149 を測定した。

3) 唾液は pH4 に調整し、アセトニトリル抽出した。試験溶液の精製はミニカートリッジの OASIS HLB を用い、溶出液はメタノール・酢酸エチル(1:9)とした。本法による唾液抽出液の精製効果は良好で、フタル酸モノエステル 5 種類の回収率は 94%以上であった。

II. ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成

1. はじめに

平成 11 年度の厚生科学研究において、我々はヒトの chewing による乳幼児用玩具からのフタル酸ジエステルの溶出について検討した。その結果、一部の玩具から溶出したフタル酸ジエステルが唾液中でモノエステル体に変化することを見出した。

そこで本年度における研究では、アルキル基の異なる 5 種類 of フタル酸ジエステルのヒト唾液中での化学変化によるモノエステル体の生成について検討した。

2. 実験方法

試薬および器具

使用する標準試薬、一般試薬および器具は前報 I に準じた。

装置

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。

HPLC 分析条件

前報 I に準じた。

GC/MS 分析条件

前報 I に準じた。

フタル酸ジエステルのヒト唾液中でのモノエステル体の生成反応

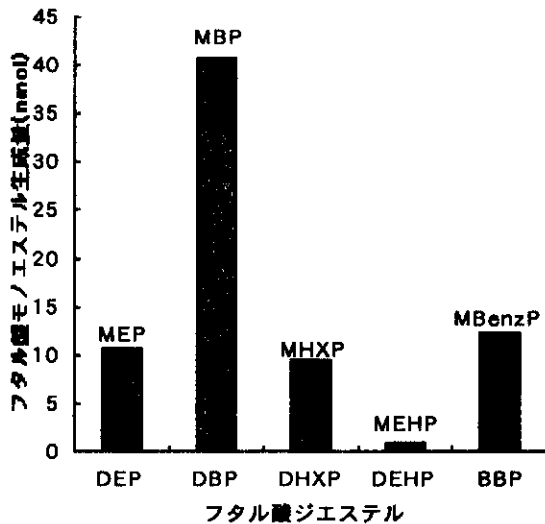
フタル酸ジエステルを含まないポリプロピレン製試験片を成人被験者(男性 2 人)の口腔内に入れ、chewing し、口腔内に溜まった唾液を採取した。採取時間は昼食前の空腹時とし、採取した唾液 15mL に人工唾液(pH7.0)5mL を加え、混合し、本実験で使用した唾液とした。この唾液 3mL を 50mL ネジ蓋付遠心分離管に入れ、フタル酸ジエステル標準溶液 10 μ L を加え、振とう培養器で 37 $^{\circ}$ C、30 分間 Incubate した。振とう培養器の振とう数は 150r.p.m.とした。Incubation 終了後、0.1NHCl で唾液を約 pH4 に調整し、アセトニトリルを 2mL 加え、生成したフタル酸モノエステルを振とう抽出した。

以下前報 I に準じ、フタル酸モノエステルを精製・濃縮し、HPLC または GC/MS-SIM 分析した。本生成反応の実験はそれぞれの唾液に対し 3 回繰り返した。

3. 研究結果および考察

ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成について検討するため、以下のような試験を行った。また、採取した唾液 pH は 7.4 および 7.1 であった。

フタル酸モノエステル生成におよぼすフタル



図II-1 アルキル基の異なるフタル酸ジエステルの唾液中におけるモノエステル体の生成

Incubation温度：37℃，Incubation時間：30℃
PAE添加量：50nmol，ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)

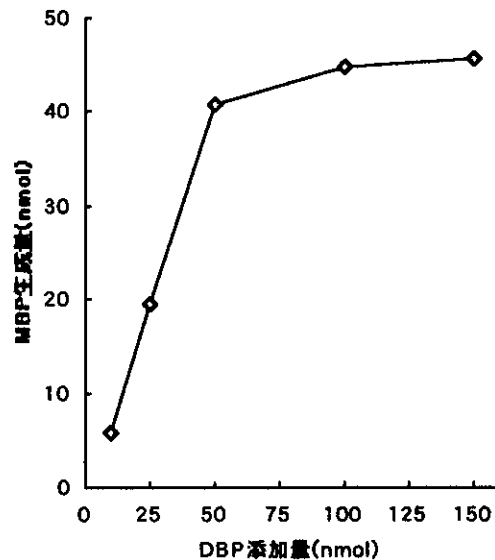
DEP:フタル酸ジエチル，MEP:フタル酸モノエチル
DBP:フタル酸ジブチル，MBP:フタル酸モノブチル
DHXP:フタル酸ジヘキシル
MHXP:フタル酸モノヘキシル
DEHP:フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
MEHP:フタル酸モノ-2-エチルヘキシル
BBP:フタル酸ブチルベンジル
MBenzP:フタル酸モノベンジル

酸ジエステルのアルキル基の影響

アルキル基の異なる DEP, DBP, BBP, DHXP および DEHP をそれぞれ 50nmol を唾液に加え、37℃、30 分間 Incubation し、生成したそれぞれのモノエステル体量を測定した。

その結果を図 II-1 に示した。Symmetric なフタル酸ジエステルである DEP, DBP, DHXP および DEHP は唾液中で 1 つのアルキル基が脱離し、MEP, MBP, MHXP および MEHP をそれぞれ 10.6, 40.8, 9.4 および 0.9nmol 生成し、その生成率は 21.2%, 81.6%, 18.8% および 1.8% であった。本実験でのフタル酸ジエステルの唾液中でのモノエステル体生成反応は直鎖のアルキル基を有す DBP が最も変化し易く、アルキル基に側鎖を有する DEHP ではその生成が悪かった。また asymmetric なフタル酸ジエステルである BBP のモノエステル体生成は、MBenzP が 12.3nmol 生成したが、MBP の生成は認められなかった。

フタル酸ジエステルは一般に腸管内のエステ



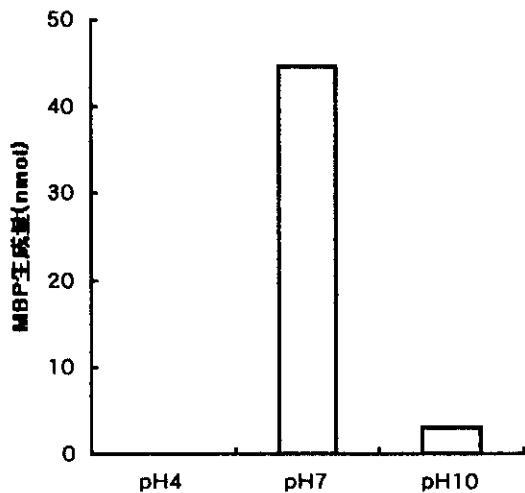
図II-2 ヒト唾液中のフタル酸モノブチル生成量におよぼすフタル酸ジブチル濃度の影響

Incubation温度：37℃，Incubation時間：30℃
ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)
DBP:フタル酸ジブチル，MBP:フタル酸モノブチル

ラーゼにより加水分解され、モノエステル体を生成することが報告されている⁹⁾。また、マウス肝ミクロソームより精製したエステラーゼがフタル酸ジエステルの鎖状のアルキルエステル基に対し基質特異性を示し、特に DBP に対し高い親和性を有すこと¹⁰⁾、さらにブタ膵臓リパーゼによる炭素数 4 つの脂肪酸エステルの特異的な加水分解反応についてそれぞれの報告がなされている¹¹⁾。本実験でのヒト唾液中のモノエステル体生成反応はフタル酸ジエステルの直鎖のアルキル基、特にエステルの炭素数が 4 つのブチルエステルに対し特異的に反応した。唾液中には数多くの酵素が存在し、これらの酵素がフタル酸ジエステルのモノエステル体生成に深く関与していることが推察された。

唾液中のフタル酸モノエステル生成におよぼすフタル酸ジエステル濃度の影響

被験者の chewing により採取した唾液に、それぞれ DBP を 10, 25, 50, 100 および 150nmol 添加し、37℃、30 分間 Incubation し、それぞれ生成した MBP 量を測定した。その結果を図 II-2 に示した。唾液に DBP をそれぞれ添加し、生成した MBP 量はそれぞれ 5.7, 19.5, 40.8,



図II-3 ヒト唾液中におけるフタル酸ジブチルのフタル酸モノブチル生成におよぼすpHの影響
 それぞれのpHは0.1NHClまたは0.1NNaOHで調整
 Incubation温度：37℃，Incubation時間：30℃
 DBP添加量：50nmol，
 DBP:フタル酸ジブチル,MBP:フタル酸モノブチル

44.8 および 45.6nmol であった。

本法による唾液中の DBP のモノエステル体生成反応は、初め MBP 生成量が DBP 添加量と共に増加し、DBP 添加量が 50nmol で MBP 生成量が最大となり、DBP を 50nmol 以上添加しても MBP 生成量に有意な増加が認められなかった。

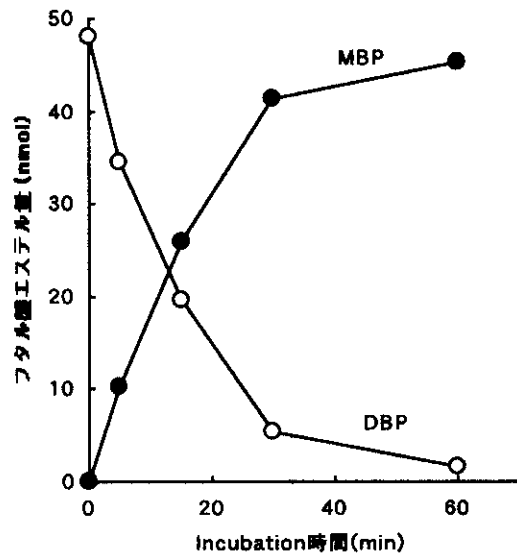
フタル酸ジエステルのモノエステル体生成におよぼす唾液 pH の影響

採取した唾液(pH7.0)のpHを0.1NHClでpH4に、また 0.1NNaOH で pH10 にそれぞれ調整した。それぞれの pH に調整した唾液に DBP を 100nmol 添加し、37℃、30 分間 Incubation し、生成した MBP 量をそれぞれ測定した。その結果を図II-3 に示した。唾液 pH が 4、7 および 10 での MBP 生成量はそれぞれ 0、44.8 および 3.1nmol であった。

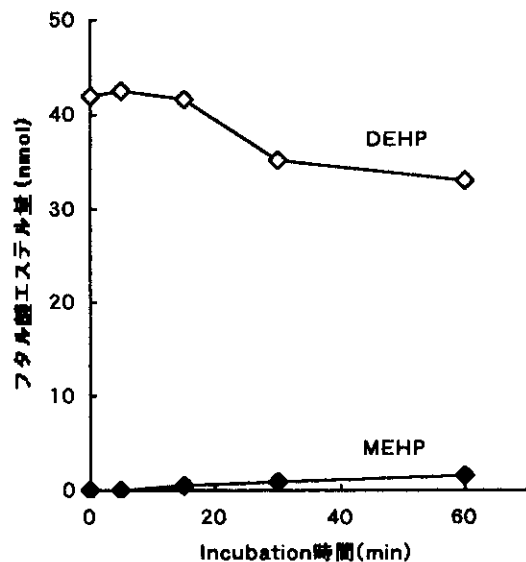
本実験による唾液中のモノエステル体生成反応は中性で進行し、唾液をアルカリ性または酸性にすると、その生成が著しく低下し、この生成反応が pH に大きく影響することがわかった。

フタル酸ジエステルのモノエステル体生成反応におよぼす Incubation 時間の影響

唾液に DBP または DEHP を 50nmol 添加し、37℃で、5、15、30 および 60 分間それぞれの



図II-4 ヒト唾液中でのフタル酸モノブチル生成におよぼすフタル酸モノブチルのIncubation時間の影響
 Incubation温度：37℃，DBP添加量：50nmol
 ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)
 DBP：フタル酸ジブチル，MBP：フタル酸モノブチル



図II-5 ヒト唾液中でのフタル酸モノ-2-エチルヘキシル生成におよぼすフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのIncubation時間の影響
 Incubation温度：37℃，DEHP添加量：50nmol
 ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)
 DEHP：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
 MEHP：フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

Incubation により生成したそれぞれのモノエステル体量を測定した。

その結果を図II-4 と5にそれぞれ示した。DBP と DEHP は 60 分間で添加量の 95%と 12%それぞれ減少した。また、MBP 生成は 15 分間で DBP 添加量の 57%、30 分間で 80%および 60 分間で

87%であった。一方、MEHPの生成は60分間で3.4%と、その生成はわずかであった。

以上より、本実験からフタル酸ジエステルが口腔内の唾液中でモノエステル体を生成することが分かった。一般に、フタル酸ジエステルは生体内に入り、腸管のエステラーゼや膵臓のリパーゼにより加水分解されモノエステル体を生成することが報告されている^{9),12)}。ヒト唾液には脂肪の消化酵素である舌リパーゼやエステラーゼが存在する。また、唾液中の様々な微生物由来の酵素も存在すると考えられている。本実験で得られた結果より、唾液中でのモノエステル体生成反応には酵素による加水分解が深く関与していることが推察される。

また、フタル酸ジエステルの生殖毒性の本体はモノエステル体であると考えられている¹³⁾。また最近フタル酸ジエステルの発ガンプロモーター活性が報告され^{1),2),3)}、モノエステル体により強い活性を示すことが見出されている¹⁴⁾。その発ガンプロモーター活性と内分泌攪乱作用の関連性が疑われていることから⁴⁾、今後この唾液中のモノエステル体生成反応の詳細を明らかにする予定である。

4. まとめ

ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルのモノエステル体生成反応はフタル酸ジエステルのアルキル基の違いによりその生成率が大きく異なり、直鎖のアルキル基、とくにブチルエステルに特異的に反応した。

唾液中でのフタル酸ジブチル(DBP)のモノエステル体生成反応はpH7でフタル酸モノブチル(MBP)生成量が最大となり、pHが4または10になると、その生成量が著しく低下した。

以上より、唾液中でのフタル酸ジエステルのモノエステル体生成反応に唾液酵素が深く関与することが推察された。

5. 参考文献

- 1) Weghorst C.M., et. al., *Exp. Toxicol. Pathol.*, 45(7), 423-31(1994)
- 2) Ledwith B.J., et. al., *J. Biol. Chem.*, 272(6), 3707-14(1997)
- 3) Isenberg J.S., et. al., *Toxicol. Sci.*, 56(1), 73-85(2000)
- 4) Asada S., et. al., *J. Health Sci.*, 47(1), 60-64(2001)
- 5) Health Canada, Ottawa, Ontario: Consumer Products Division, Product Safety Bureau, Environmental Health Directorate, Health Protection Branch, 1998a
- 6) Hashimoto, N., et. al., *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1475-78(1981)
- 7) Kawamura, Y., et. al., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 40, 189-197(1999)
- 8) Tsumura, Y., et. al., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 41, 254-260(2000)
- 9) Lake B.G., et. al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39, 239-248(1977)
- 10) Kayano Y., et. al., "Abstr. 21st Symp. Toxicol. Env. Health," Osaka, p.51-52, 1995.
- 11) Entressangels B., et. al., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43, 581(1961)
- 12) Eriksson P., et. al., *Toxicology.*, 37, 189-204(1986)
- 13) 中村好志他, *衛生化学*, 33, 71(1987)
- 14) 私信

6. 研究発表

学会発表

- 1) フォーラム 2000 : 衛生薬学・環境トキシコロジー(東京, 2000年10月)
- 2) 第80回日本食品衛生学会学術講演会(福島, 2000年11月)