

# 分担研究報告書

## フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究

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

食物経由のフタル酸エステル暴露量を調査するために、GC/MS による一斉分析法を4機関で検討し、各種食品の汚染実態調査を行った。各機関でそれぞれ試験溶液調製法とGC/MS 測定条件を設定し、操作ブランク値の低減化と再現性について検討した。さらに同一試料を用いて添加回収試験を実施するとともに、各試験法で分析した分析値を比較した。その結果、回収率は d-体標準品で補正することによりほぼ均一な値が得られたが、一部の分析値には機関間で差が見られた。各種食品について添加回収試験及び汚染実態調査を実施し、妥当な回収率が得られたものについて調査データを示した。

### 研究協力者

高橋 哲夫 北海道立衛生研究所  
平間 祐志 北海道立衛生研究所  
兼俊 明夫 北海道立衛生研究所  
桂 英二 北海道立衛生研究所  
藤本 啓 北海道立衛生研究所  
酒井 洋 新潟県保健環境科学研究所  
小林ゆかり 新潟県保健環境科学研究所  
斉藤 勲 愛知県衛生研究所  
外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所  
石光 進 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所  
津村ゆかり 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所  
佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所

塑剤として用いられているフタル酸エステル (PhE と略称) が環境汚染物質の1つとして問題視されるようになったのは 1972 年頃からである。一般的に、PhE は環境中での生分解性がよく、濃縮性や生物に対する一般毒性はそれほど高くないと言われているが、その使用量が多く、環境 (空気、水、土壌) や生物からは常に検出され分布が普遍的であり、かつプラスチックという難分解性の製品中に組み込まれて、廃棄方法の如何によっては、永続的な汚染をもたらす可能性がある。

また近年、フタル酸ジエチルヘキシルをはじめとする PhE 類が内分泌かく乱性を有すると報告され、食品の安全性確保の上から、食品中の PhE 類濃度の実態を把握し、摂取量の推定及びリスク評価を行うことが求められている。

### A. 研究目的

プラスチック、特に塩化ビニル樹脂の可

しかしながら、PhE 類は実験室環境や分析に使用する器具、試薬等を広範囲に汚染

していることが知られており、食品中の微量な PhE 類の正確な測定には非常な困難が予想される。

そこで本研究では、11 種の PhE 類及びアジピン酸ジエチルヘキシルを対象に試薬、器具及び実験操作中の汚染に起因する操作ブランク値の低減化とその再現性についての検討を行って、食品試料中の PhE 類を正確に分析する手法を確立する。さらに、各種生鮮食品及び陰膳試料の分析をおこない、PhE 汚染実態を把握する。

## B. 研究方法

調査研究は 4 機関で実施した。研究方法及び結果について必要に応じて、それぞれ機関名 A, B, C, D と区別して記載した。

### 1. 研究対象化学物質

- ①ジエチルフタレート DEP
- ②ジ n-プロピルフタレート DPrP
- ③ジ n-ブチルフタレート DBP
- ④ジ n-ペンチルフタレート DPeP
- ⑤ジ n-ヘキシルフタレート DHexP
- ⑥ジシクロヘキシルフタレート DcHP
- ⑦ジ (2-エチルヘキシル) フタレート DEHP
- ⑧ジ n-オクチルフタレート DOP
- ⑨ブチルベンジルフタレート BBP
- ⑩ジイソオクチルフタレート DiOP
- ⑪ジイソノニルフタレート DiNP
- ⑫ジ (2-エチルヘキシル) アジペート DEHA

### 2. 試料

分析法の相互比較を行うための試料とし

て、市販の同一製造ロットの缶入りバターを使用した。実態調査試料には、市販の生鮮食品、弁当及び給食施設等の定食をそれぞれの機関で入手して使用した。

### 3. 試薬・器具

標準品：DEP, DPrP, DBP, DPeP, DHexP, DcHP, DEHP, DOP, BBP, DiOP, DEHA は各試薬会社の PhE 試験用標準品、環境分析用標準品または可塑剤試験用標準品を用いた。DiNP は特級試薬を用いた。

d-体標準品：DEP-d4, DBP-d4, DPeP-d4, DEHP-d4, BBP-d4, DOP-d4 は関東化学(株)または林純薬工業製標準品を用いた。

有機溶媒：機関 A のヘキサン及び機関 D のアセトン、ヘキサンは PhE 試験用、その他の溶媒及び機関 B, C は残留農業試験用 300 または 1000 倍濃縮検定品を使用した。

フロリジル：(A)和光純薬(株)製フロリジル PR を 400 °C で 5 時間以上加熱後放冷し、6 % (w/w) 相当の精製水を加えた。(B)同フロリジル PR を 180 °C で 12 時間以上活性化した。(C)フロリジル PR を活性化せずに使用した。(D)500 °C で 5 時間加熱した後、6 % 相当の精製水を加えた。

フロリジルカラム：(A)内径 13mm, 長さ 300mm のガラスカラムに 6% 含水フロリジル 1.5 ~ 2 g をヘキサンを用いて湿式充填し、無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層した。(B)内径約 5.7mm, 長さ約 10cm のガラス管にフロリジル 1g を乾式充填し、無水硫酸ナトリウム少量を積層したものを、180 °C で 12 時間以上活性化し、使用前にヘキサン 10ml でコンディショニング

グした。(C)ガラスカラムに フロリジル 1 gを充填し、50%アセトン/ヘキサン及びヘキサン各 10ml で洗浄した。(D)内径 13 mm、長さ 300mm のガラスカラムに 6%含水フロリジル 1 gをヘキサンを用いて湿式充填し、無水硫酸ナトリウム約 1 gを積層した。

塩化ナトリウム：(A)和光純薬(株)製 残留農薬試験用試薬を 400 °Cで 5 時間以上加熱後放冷した。(B)同社製特級試薬を 200 °Cで 6 時間以上加熱した。(C)残留農薬試験用試薬。(D)残留農薬試験用紙薬を 500 °Cで 5 時間加熱した。

10%食塩水：(B)塩化ナトリウム 70g を水道水 700ml に溶かし、ヘキサンで洗浄した。

無水硫酸ナトリウム：(A)関東化学(株)製 PhE 試験用試薬を 400 °Cで 5 時間以上加熱後放冷した。(B)和光純薬(株)製特級試薬を 200 °Cで 6 時間以上加熱し、デシケータ中で放冷したものを、使用時ヘキサンで洗浄した。(C)残留農薬試験用試薬(D) PhE 試験用試薬。

水：(A)ミリQ水(ミリポア製 Milli-Q)をヘキサンで洗浄した。(C)精油定量器を用い、ヘキサンを捕集液として 1.5 時間蒸留精製した。(D)PhE 試験用試薬。

器具：いずれもガラス製またはステンレス製のものをを用いた。(A)200 °Cで 5 時間以上加熱し放冷したものを、使用直前にアセトン及びヘキサンで洗浄した。(B)ピペット類以外の器具は、洗剤洗浄後 200 °Cで 6 時間以上加熱し放冷したものを、使用直前にアセトン及びヘキサンで洗浄した。ただし、肉類の分析に用いる器具は加熱を行

ったが、溶媒による洗浄は行わなかった。ピペット類は全て加熱は行わず、使用直前にアセトン及びヘキサンで洗浄した。(C) 200 °Cで約 3 時間加熱、使用前にアセトンで洗浄。分液ロートはアセトン-水で振とう洗浄した。(D)洗剤(和光純薬製コンタミノン)及び水道水で洗浄し、さらに超純水(ヤマト工業製 WG260 で蒸留後、ミリQでろ過)で洗った後、200 °Cの乾燥機内で 2 時間加熱し、放冷後使用直前にヘキサンで洗浄した。

ろ紙：アセトンで洗浄した。

#### 4. 測定条件

機関により、GC/MS 操作条件の詳細は異なるが、機関Aの測定条件及びモニターイオンを示した。

装置：shimadzu GCMS QP-5000

イオン源：EI 専用イオン源

分離カラム：DB-5MS (30m × 0.25mm I.D., 膜厚 0.25 μm, J & W)

カラム温度：50 °C(2min)→ 10 °C/min → 270 °C(13min)

キャリアガス：高純度ヘリウム 圧力 100kPa 全流量 100ml/min

カラム流量 1.7ml/min

注入口温度：300 °C

注入方法：スプリットレス サンプルング時間 1.5min

注入量：1 μl

インターフェース温度：280 °C

検出器電圧：1.5kV

測定法：SIM

	定量イオン	参照イオン	サロゲート物質 (定量イオン)
DEP	149	177	DEP-d4(153)
DPrP	149	191	DBP-d4(153)
DBP	149	205	DBP-d4(153)
DPeP	149	237	DPeP-d4(153)
DHexP	149	251	DPeP-d4(153)
DcHP	149	167	—
DEHP	149	167	DEHP-d4(153)
DOP	149	279	DOP-d4(153)
BBP	149	206	BBP-d4(153)
DiOP	149	279	—
DiNP	149	293	—
DEHA	129	147	BBP-d4(153)

## 5. 定量

機関A, B及びCでは d-体の標準品をサロゲートとして試料に添加して, 測定値の補正を行った. d-体が入手できなかった化合物については保持時間が近い他の化合物の d-体で補正した. 機関Dは, GC/MS測定時の補正のために試験溶液に内部標準として d-体を添加した.

DiOP 及び DiNP は混合物なので, 検出されたピークのうち DiOP は中心の 2 本, DiNP は中心の 5 ~ 6 本のピーク面積の合計で定量した.

## 6. 検出限界の設定

空試験において操作ブランクが検出された化合物については, 操作ブランク値の標準偏差の 3 倍を検出下限値とした. 操作ブランクが検出されなかったものについては, 検量線用溶液の最小濃度である 10ng/ml または標準溶液を測定したとき

S/N=3 となる溶液濃度を試料当たりの濃度に換算した値を検出下限値とした.

## 7. 試験溶液調製法

1) 分析法の相互比較に使用したバターの分析法 (図 1)

機関A: バター 2g をビーカーに取り, 30ml のヘキサンで溶解し, 分液ロートに移し 100ml の 5%含水アセトニトリルを加え 10 分間振とう後, アセトニトリル層を分取した. 以下の操作手順は図 1 に従った.

機関B: バター 2g をビーカーに取り, 30ml のヘキサンで加温溶解し, 分液ロートに移し 150ml のアセトニトリルを加え 5 分間振とう後, アセトニトリル層を分取した. 以下の操作手順は図 1 に従った.

機関C: バター全量を溶かし, その 3g を分液ロートに移し 30ml のヘキサンで溶解し, 100ml, 50ml のアセトニトリルを加え振とう後, アセトニトリル層を分取した.

アセトニトリル層に水 5ml を滴下し、分離してきたヘキサン層を除去した。以下の操作手順は図 1 に従った。

機関D：バター 2g をビーカーに取り、分液ロートに移し 100ml、100ml のアセトンを加え 5 分間振とう抽出した。以下の操作手順は図 1 に従った。

## 2) 実態調査試料の分析法

試験溶液調製法は各機関とも試料によって異なるが、陰膳、弁当試料の分析法を図 2-1 ~ 2-4 に示した。概略は下記の通りであり、特徴的な操作は、機関 A, B, C が d-体を添加して回収率補正を行ったこと、機関 D は抽出溶媒にアセトンを使用し、その他の機関はアセトニトリルを使用したこと、及び機関 C が精製にゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)を使用したことである。

機関A及びB：d-体添加－アセトニトリル抽出－ヘキサン洗浄（脱脂）－ヘキサン転溶－フロリジルカラム精製－GC/MS

機関C：アセトニトリル抽出－水層分離－GPC－フロリジルカラム精製－GC/MS

機関D：アセトン抽出－酢酸エチル/ヘキサン転溶－アセトニトリル分配－フロリジルカラム精製－GC/MS

## 8. 食品の汚染実態調査

各機関で購入した市販生鮮食品、弁当及び給食施設等の定食を各機関の方法で分析した。試料には適宜水を添加してホモジナイズした。均一化した各試料の分析は n = 2 または 3 で実施した。試料と併行して操作ブランクを n = 1 ~ 5 で分析した。試料の測定値から、併行して分析した操作ブランク (n=1 の場合以外は平均値) を差し引

いた値の平均を定量値とした。

## C. 研究結果

### 1. GC/MS 測定法の検討

食品中に含まれる PhE 類の一斉分析には GC/MS が適しているので、GC/MS による測定条件を検討しモニターイオン等を決定した。測定対象のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の 1 例を図 3 に示した。

DiOP 及び DiNP 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。

### 2. 操作ブランクの由来

#### ① GC/MS におけるバックグラウンド

GC/MS 測定において、セプタムまたはインサート由来のバックグラウンドが検出された。GC 由来のバックグラウンドは、機関 D では DEP が 10 ~ 20pg/注入、DBP が 1 ~ 3pg/注入であった。GC 注入口のセプタムにはスベルコ製グリーンセプタム (機関 D) あるいは Marlin Microseal (機関 C) を使用した。

#### ② 有機溶媒及び水由来のバックグラウンド (機関 D)

有機溶媒 200ml を 100 倍濃縮して測定したところ、残留農薬試験用溶媒 (アセトニトリル、シクロヘキサン、酢酸エチル) からは DBP が 0.1 ~ 0.2ng/ml, DEHP が 1 ng/ml 検出された。PhE 試験用ヘキサン、アセトンからは DBP が 0.1ng/ml 前後 DEHP が 0.1 ng/ml 前後検出された。また各種の水 300ml をヘキサン 3ml で抽出して測定したところ、検討した水全てから 3 種類の PhE が検出され、蒸留水には DEP,

DBP が多く、さらにミリQで精製すると DBP, DEHP が多く検出された。また、水道水からは多量の DEP の他に、PhE 以外のピークが複数検出された。これらの値は必ずしも溶媒等に本来存在していた PhE とはいえないが、試薬及び操作ブランク値をゼロにすることが困難であることを示すものである。

### ③器具由来のバックグラウンド

ガラス器具 (300ml 容及び 50ml 容のナスフラスコ及び 350ml 容の遠沈管) を順次洗浄したアセトン 100ml を 50 倍濃縮して測定したところ、DBP が 1.98  $\mu$  g/ml, DEHP が 1.83  $\mu$  g/ml 検出された。200  $^{\circ}$ C で 3 ~ 4 時間加熱した器具ではそれぞれ 0.15 及び 0.05  $\mu$  g/ml であり、アセトンを同倍率に濃縮したときの検出濃度と差がなかった (機関 C)。ガラス器具は、いずれの機関でも加熱後、アセトンまたヘキサンで洗浄した。器具は PhE 分析専用とすることが操作ブランクの低減に効果的と推察された。

## 3. 操作ブランク値の変動と検出限界

2. で述べたように、PhE 分析における操作ブランクをゼロにすることは不可能であることから、PhE 類の検出限界は操作ブランク値の変動から求める必要があった。

各機関の陰膳試料の分析法における操作ブランクを試料中濃度に換算して表 1 に示した。DBP, DEHP がほとんど全ての操作ブランクから検出された。DEP, BBP 及び DEHA も高い検出率を示した。一方、DPrP, DPeP, DcHP, DOP, DHexP, DiOP 及び DiNP は全くまたはほとんど検出され

なかった。同一機関でも分析日によって変動が認められた。特に実験室環境の変化によって PhE 類の検出項目並びに検出量が著しく増加する結果が得られた。従って試料分析と併行して常に空試験を行い操作ブランク値を確認することが不可欠であることが分かった。

操作ブランク値の標準偏差から求めた検出限界は機関、分析試料の重量や分析日によって差はあるが、試料中濃度に換算して DEHP, DBP では 6 ~ 47ng/g であった。従って試料の測定値から併行して測定した操作ブランク測定値を差し引いて 6 ~ 47ng/g 以上であった場合に有意な定量値と考えられる。

また、各機関のバター分析法の操作ブランク値は表 2 の通りであった。検出されるものは陰膳試料の分析法の操作ブランクと類似していたが、それらの値は分析に供する試料量がバターは 2 ~ 3 g と陰膳試料より少ないため高くなった。標準偏差も大きくなるため、バター分析法の検出限界は陰膳試料分析法のそれより大きくなった。

## 4. 測定値の再現性

操作中に偶発的な PhE 汚染が生ずることが懸念されるため、試料は全て 2 試行または 3 試行ずつ分析し、測定値に大きな差がないことを確認した。

## 5. 分析法及び分析値の比較

### 1) バターの添加回収試験結果

共通試料であるバターへの添加回収試験結果を表 3 に示した。

機関 A, B, C 及び D における添加回収

率はそれぞれ 52 ~ 115%, 37 ~ 110 %, 59 ~ 126%及び 66 ~ 101%の範囲であった。

d-体で補正していない機関 D では、DEHP, DOP の回収率が低かった。機関 A の d-体補正していない DiOP, DiNP も回収率が 52, 58 %と低かった。機関 A の 9 化合物及び機関 B, C は d-体で補正した回収率であるが、DEHA の回収率はいずれも低かった。機関 B において添加量を 5000ng/g で検討したところ、250ng/g 添加のとき 37%であった DEHA の回収率は 92%と良い結果が得られたことから添加濃度がブランク値(バター及び操作ブランク)に比べて低すぎたことを示している。また、DEHA のサロゲートとして DEHP を使用したことも定量値を低くする原因になったと考えられる。

## 2) バターの分析結果

同一製造ロットの缶入りバター 11 個を各機関で分析した結果を表 4 に示した。DBP, DEHP 及び DEHA が全試料から検出された。

各機関の分析値は、BBP は 100 ~ 130 ng/g, DEHP は 1400 ~ 2210 ng/g, DEHA は 120 ~ 1690 ng/g の範囲にあった。DEHA は機関 A の分析値が低かったために (d-BBP をサロゲートにしているため回収率補正が不十分、GC/MS カラムの汚れ等に起因すると考えられる) 機関で分析値の差が大きかったと考えられる。

DBP は各機関の操作ブランク値が 138 ~ 583 ng/g と高い上にその変動係数が大きかったために検出した機関と検出限界以下との差がでた。

## 6. 実態調査試料分析法の検討 (添加回収試験結果)

実態調査試料は各機関独自の分析法を設定し、添加回収試験を実施した。

アセトン抽出液を酢酸エチル/ヘキサンに転溶する方法を用いた機関 D の回収率を表 5 に示した。ばれいしよでは平均回収率 83.2 ~ 107.2%の良好な結果が得られた。精白米は、DEHP の回収率の標準偏差が大きかったが、79.6 ~ 100.1%の良好な結果が得られた。弁当は、ブランク値の高い DEHP の回収率にバラツキは見られるものの、全体的にはほぼ良好な回収率が得られた。バターは、ブランク値の高い DEHP が 55.9%, DOP が 67.9%の回収率であったが、他の PhE 類の回収率はほぼ良好な結果が得られた。

機関 A, B 及び C は抽出にアセトニトリルを使用した。食品によっては抽出時に試料の固化が起こりやすいため、水を添加してホモジナイズまたは超音波抽出を行った。高脂肪性試料に適用したアセトニトリル抽出液をヘキサンで洗浄する脱脂法はアセトニトリルの含水量によっては PhE がヘキサン層に移行することが予想される。特に長アルキル鎖の PhE では回収率が低くなり、d-体での補正を行っても測定値が不正確になる可能性が示唆された。

## 7. 汚染実態調査

各機関で市販食品を購入し、汚染実態調査を行った。分析結果及び各試料毎の検出限界を表 6 に示した。表には調査結果の中で各化合物及び d-体化合物の添加回収率が良かった項目のデータを選別して示し

た。

すなわち、絶対検量線で定量した機関及び項目については、添加回収試験で 60%以上の回収率が得られた食品一化合物の定量値を、d-体を試料に添加して補正した場合には、添加回収試験で各化合物及び補正に用いた d-体がともに 50%以上回収された項目の定量値を示した。

データ数が少ないので結論は出せないが、DBP, DEHP 及び DEHA が広範囲の食品から検出され、特に弁当類では DEHP 濃度が高い傾向がみとめられた。

## D. 考察

### 1. 操作ブランク

研究方法に示したように各機関とも使用する器具、溶媒、試薬等についてブランク値を低くする努力をしたが、DBP, DEHP, DEHA はブランク値をゼロにすることはできなかった。そこで、特に DEHP は分析試料量が少ない場合は検出限界を数百 ng/g 以下にすることは困難であった。操作ブランクは試験を繰り返す間に安定する傾向が認められたので、同一手法、同一器具を用いて試験を繰り返すことがブランクの低減化につながり、実試料の分析に際しては必ず操作ブランクを併行して試験することが、分析値の信頼性を高めるために必要と考えられた。

### 2. バターの分析結果

各機関で分析したバターは缶入りの同一製造ロットであることから、各機関の DEHA 分析値の相違は分析法の違い及び測定時の GC/MS の調整不良等が原因とし

て考えられる。

## 3. 試験溶液調製法

アセトニトリル抽出は試料によっては固化する等、再検討の余地がある。脱脂操作としてアセトニトリル抽出液をヘキサンで洗浄する方法はアセトニトリルの含水量が多いとヘキサン層に PhE が移行するので、適切な方法ではなかったと考えられる。しかし、クリーンアップ後の試験溶液に PhE の標準品を添加した場合でも保持時間の長い、長鎖の化合物の測定値が低い傾向があり、GC/MS 測定に対する試料マトリックスの影響も考えられる。

## 4. 実態調査結果

今回の実態調査に使用した分析法は化合物によっては回収率が低かったため、摂取量の推定には回収率の高い分析法を使用し再度汚染実態調査を行う必要がある。その際には今回検討した結果を基に、操作ブランクを低く安定させ、操作ブランクの確認試験と併行した食品試料分析を行うことが必須である。

また、混合物である DiOP, DiNP 以外の化合物は d-体が市販されているので、個々の試料に d-体を添加して回収率を確認または補正することは、一斉分析で特定の化合物の回収率が低いような場合には正確な定量値を求める上で有意義である。

しかし、定量に使用する d-体標準溶液の PhE 汚染も懸念されるため、その管理には十分注意する必要がある。

## E. 結論



・ PhE 分析の操作ブランク低減化について検討し、対策を明らかにした。

・ 避けられない操作ブランクから、達成できる検出限界を明らかにした。

・ 共通試料の分析を行い、分析値の相互比較を行った。

・ 弁当、定食、各種食品中の汚染実態調査を実施し、汚染実態の傾向を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし