

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

化合物の中には、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、ぶどう、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、ぶどう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)

注入時圧力プログラム：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化は、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

同時分析が困難であったために調査対象から除外したビスフェノールAについても今後、食品中の分析法を確立し、特に環境汚染に由来する食品汚染の実態を明らかにして行きたい。

E. 結論

1) 内分泌攪乱性の疑いが指摘されている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GC/MSで同時測定する系を確立した。

2) 上記の12化合物を対象として、精白米、畜産物 (豚肉, 牛肉, 鶏肉, レバー), 水産物 (近海魚, 養殖魚, 遠洋魚, 養殖カキ), 乳製品 (バター, チーズ, 牛乳), 野菜 (ばれいしょ, ほうれんそう, ブロッコリー, もやし, 大葉), 果実 (りんご, ぶどう, いちご), 缶詰 (コーン, ツナ, コンビーフ) について汚染実態調査を行った。

3) 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

参考文献

- (1) Coldham, N.G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D.P., Connor, C., Sauer, M.J.: Environ. Health Persp, 105, 734 (1997)
- (2) White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G.: Endocrinology, 135, 175 (1994)
- (3) Lewis, S.K., Lech, J.J.: Xenobiotica, 26, 813-819, 1996
- (4) Ahel, M., Mcevoy, J., Giger, W.: Environmental Pollution 79, 243-248, 1993
- (5) 津田泰三ら: 全化協, 120頁 1998
- (6) Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M.: Environmental Pollution 64, 107-120, 1990
- (7) Meldahl, A.C., Nithipatikom, K., Lech, J.J.: Xenobiotica, 26, 1167-1180, 1996
- (8) Coldham, N.G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottinger, T.G., Goodall, C., Sauer, M.J.: Drug Metabolism and Disposition, 26, 347-354 (1998)