

## 分担研究報告書

### フタル酸エステル類の食品汚染実態及び摂取量に関する調査研究

分担研究者 外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 食品試験部長

#### 研究要旨

内分泌かく乱作用が疑われているフタル酸エステル類について、日本国内で喫食されている食品の汚染実態及び摂取量を把握するための研究を行った。フタル酸エステル類 11 種及びアジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHA)を調査対象とし、実験操作過程で生じるバックグラウンドの低減化を図った。試料をアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配及びフロリジルと PSA を組み合わせたカラムで精製し、GC/MS で測定する分析法を開発した。この方法を用いて 3 機関で同一の試料を分析した結果、標準偏差の幅は平均値の 10%未滿または検出下限値(LOD)以下で、分析値はよく一致した。実態調査として市販弁当・定食及び病院給食を分析した結果、いずれにおいても DEHP の検出量が最も高かった。弁当 10 検体からは一食中の摂取量として平均 1768  $\mu$ g の DEHP が検出され、3 検体が EU における体重 50kg のヒトの耐容一日摂取量(TDI)1850  $\mu$ g を上回っていた。定食 10 検体中 DEHP は一食当たり平均 40  $\mu$ g であり TDI を越えたものは無かった。3 地域の 3 病院において提供された給食各 1 週間分(計 63 検体)においては、一日当たり(3 食分合計)の摂取量は DEHP が平均 519  $\mu$ g であり、2 日分が TDI を上回っていた。DEHA は平均 86  $\mu$ g、DiNP は 62  $\mu$ g、BBP は 4.7  $\mu$ g の一日摂取量であった。DEHP 以外のフタル酸エステル類の摂取量は、弁当・定食・病院給食のいずれの検体においても TDI の 2%未滿であった。

研究協力者	石光 進	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所	
酒井 洋	新潟県保健環境科学研究所	津村ゆかり	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
小林ゆかり	新潟県保健環境科学研究所	開原亜樹子	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
斎藤 勲	愛知県衛生研究所		

## A．研究目的

フタル酸エステル類(PhE)は主にポリ塩化ビニル(PVC)製品の可塑剤として広く用いられている。一部の PhE は齧歯類の生殖器に作用を及ぼしたり発癌性を示すことが以前から知られている<sup>1)</sup>。また、環境庁はフタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジプロピル、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル(DcHP)、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)の8種類の PhE を内分泌かく乱作用を有する疑いがある化合物としてリストに収載している<sup>2)</sup>。現在 PhE の内分泌かく乱作用については確たる判断を下せる情報が得られていないが<sup>3)</sup>、生産量が非常に多い(我が国における生産量は平成10年で約40万トン<sup>4)</sup>)ことから、その健康影響に対する消費者の関心が高い。PhE は主に食品から人体に摂取されると考えられるため、食品の汚染実態調査、一日摂取量の把握、及びそのための分析法の確立が急務である。

しかし既存の報告は単一の食品ごとの分析が主であり、一日摂取量の把握に欠かせない食品混合物での報告がほとんど無い。また、環境庁のリストに収載されているような多種類の PhE を同時に分析した例は少ない。さらに、

PhE は実験室環境にも広汎に検出されるため、分析に当たっては、試験操作中の汚染(バックグラウンド)をいかに低減するかが重要な課題である。

本研究班の協力研究者は、平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「内分泌かく乱物質の食品、食器等からの曝露に関する調査研究(主任研究者 斎藤行生)」に参加し、各機関で分析法を検討して各種市販食品中の PhE 濃度の調査を行った。今年度本研究班においては、各機関の試験法を統一し、市販弁当、定食、病院食中の PhE の残留実態調査を行った。分析対象 PhE としては、環境庁リストに収載された8種に加え、標準品の入手が容易なフタル酸ジ-n-オクチル(DOP)、フタル酸ジイソオクチル(DiOP)、フタル酸ジイソノニル(DiNP)、及び環境庁リストに収載されており同じく可塑剤として汎用されているアジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHA)も取り上げ、合計12化合物を同時分析した。

## B．研究方法

用いた試薬や機器の銘柄は各機関で若干異なるが、機関Cの場合について示す。

### 1．試料

#### (1) 試験法検討用試料

市販弁当：大阪市内のコンビニエン

ストアで購入した幕の内弁当。中身をすべて混合して試料とした；模擬朝食：食パン，マーガリン，牛乳，バナナを混合して試料とした；模擬夕食：レトルトのドリアとトマト煮を混合したもの。

### (2) クロスチェック用試料

レトルトチキンライス：米，野菜，肉，油脂等を原料としたもの。同一ロットの製品 30 箱を購入し，各機関においてパウチ 5 袋の内容物（計 400g）を混合して試料とした。

### (3) 実態調査用試料

市販弁当：99 年 8 ～ 9 月に大阪市内のコンビニエンスストア 10 チェーンで購入した幕の内弁当 10 検体；定食：99 年 9 ～ 11 月に大阪市内のレストラン 10 店舗で購入した定食 10 検体；病院給食：99 年 10 ～ 12 月に大阪・愛知・新潟の 3 病院で提供された給食各 1 週間分，計 63 検体。

## 2. フタル酸エステル類標準品

DEP，DBP，DcHP，DEHP，DOP，DiOP，DiNP；フタル酸ジプロピル，フタル酸ジペンチル，フタル酸ジヘキシル，フタル酸ブチルベンジルについては直鎖の異性体（DPrP，DPeP，DHexP，BBP）を用いた。（以上和光純薬，関東化学，東京化成，Riedel-de-Haen 製）。

これらのうち DiOP と DiNP は各種異性体の混合物である。DiOP のピー

クの一部は DcHP 及び DEHP と重なるため，標準溶液は DiOP と DiNP の混合溶液及びそれら以外の PhE と DEHA の混合溶液の 2 つに分けて調製した。標準溶液はヘキサン溶液とした。

## 3. 内部標準

DEP-d4，DPrP-d4，DBP-d4，DPeP-d4，BBP-d4，DHexP-d4，DEHA-d8，DcHP-d4，DEHP-d4，DOP-d4，DNP-d4（林純薬製，関東化学製）。内部標準溶液はヘキサン溶液とした。サロゲートとして 1 試料につき 2000ng/mL 溶液 1mL を添加した。

## 4. その他の試薬

アセトン，ヘキサン，無水硫酸ナトリウム，水：以上フタル酸エステル試験用（関東化学及び和光純薬製）；アセトニトリル，塩化ナトリウム：残留農薬試験用（和光純薬製）；フロリジル：フロリジン社製フロリジル PR；PSA：バリアン社製 BONDESIL PSA 40  $\mu$ m。

## 5. 器具・試薬の前処理

ガラス器具は 200℃ で 2 時間加熱し，使用直前にヘキサンの洗浄した。塩化ナトリウム，フロリジルは 200℃ で 2 時間加熱した。

## 6. フロリジル+PSA カラム

内径 15mm，長さ 110mm のガラス製注射筒に脱脂綿で栓をし，フロリジル 1 g，その上に PSA 0.5g，無水硫酸ナトリウム 1 g をヘキサンを用いて充填

した．使用前にアセトン 10mL，次いでヘキサン 10mL を注入して洗浄した．

## 7．試験溶液調製法

試験法の概要を Scheme 1 に示した．  
ホモジナイズした試料 50g を 200mL 容の遠沈管に採り，サロゲートを加える．（試料によりホモジナイズし難い場合は水を加える．弁当は水分が少ないため，試料と同量の水を加える．）これをアセトニトリル 100mL で 2 回抽出し，3000rpm で 5 分間遠心沈降する．上澄みを合わせ，食塩 7g を加え，5 分間機械振とうする．水層を分取して捨てる．アセトニトリル層にアセトニトリル飽和 n-ヘキサン 40mL を加え，5 分間機械振とうする．再び水層を捨て，アセトニトリル層を分取して濃縮乾固する．（濃縮後に水層が残る場合がある．）これをヘキサン 5mL に溶解して 10mL 容の共栓付きスピッツに移し，30 秒間振とうして上層をフロリジル + PSA カラムに負荷し，流出液は捨てる．スピッツ内に残った水層に再びヘキサン 5mL を加えて振り混ぜ，上層を同カラムに負荷して流出液は捨てる．5%アセトン / ヘキサン 10 mL を同カラムに注入して流出液を採る．これを濃縮してヘキサンで 2mL に定容し，GC/MS に注入する．

## 8．GC/MS条件

機種：島津 QP-5050 + GC-17A + AOC-20i；カラム：J&W DB-5（膜厚

0.25  $\mu$  m，内径 0.25mm，長さ 30m）；  
気化室温度：260 ；カラム槽温度：  
50 （1 min）（10 /min） 270  
（27min）；キャリアガス：高純度ヘリウム 圧力 100kPa；全流量：20mL/min  
；注入方法：スプリットレス（サンプリング時間：3 min）；インターフェース温度：260 ；注入量：1  $\mu$  l；  
検出器電圧：1.30kV（通常），1.00kV（通常の電圧でスケールオーバーした場合）．

## 9．定量法

試料液を GC/MS に注入し，各 PhE のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値を標準溶液のそれと比較して定量した．DiOP は主要な 2 本のピークを，DiNP は主要な 5 本のピークを，それぞれ面積を合計して定量対象とした (Fig.1) ．

測定日ごとに水 50mL を試料と同様に，かつ同時に操作して空試験値を求めた．一連の実験期間中の空試験値の平均を試料の測定値から差し引いて試料中検出量とした．空試験で検出される PhE についてはその検出値の標準偏差の 3 倍を，検出されない PhE については GC/MS で S/N 比が 3 となる濃度を検出下限値とした．

V 病院の試料は 1 検体について 3 試行分析し，3 試行の平均値と標準偏差を求め，標準偏差が平均値の 20% 以上となった場合は平均値との差が最も大

きい1試行の値を除外して2試行の平均値を採用した。その他の試料は2試行分析を行い、各試行の測定値の平均値を検出値とした。

## 10. 確認法

検出下限値付近の濃度で明瞭でないピークについては、確認イオンによる定量も行い、測定イオンによる定量値との差が20%以内の場合に検出と判定した。

## C. 研究結果

### 1. 試験法の検討

#### (1) GC/MS条件

11種のPhE及びDEHAは実験方法に示した条件で良好に定量できた。定量イオン・確認イオンと内部標準の組み合わせをTable 1に示した。標準溶液のクロマトグラムをFig.1に示した。

#### (2) 空試験における回収率

空試験におけるサロゲートの添加回収率をTable 2に示した。分子量の小さいDEP, DPrP, 分子量の大きいDEHA, DEHP, DOP, DNPでは50%未満であり、中程度の分子量のPhEは50%以上の回収率であった。

空試験におけるPhEの添加回収率をTable 3に示した。サロゲートの回収率によって補正した結果、66.6～142.8%の回収率が得られた。

#### (3) 試料への添加回収

模擬朝食、市販弁当、模擬夕食に

PhE 10～320ng/gを添加して回収試験を行った。各食品試料におけるサロゲートの添加回収率をTable 4に示した。31.3～101.4%の回収率が得られた。各食品試料におけるフタル酸エステル類の添加回収率をTable 5に示した。サロゲートの回収率によって補正した結果、62.5～132.2%の回収率が得られた。食品試料溶液のクロマトグラム例をFig.2に示した。

## 2. 試験法のクロスチェック

### (1) d-体の回収率

3機関において、同一のレトルト食品試料を用いて試験法のクロスチェックを行った。試験操作としては、空試験3試行、無添加3試行、添加3試行を行った。それぞれのd-体の回収率をTable 6～8に示した。3機関の平均で、空試験では26.5～73.5%、無添加試料では39.8～92.1%、添加試料では37.1～88.1%の回収率が得られた。

### (2) 操作ブランク値

各機関における空試験でのPhE検出量（操作ブランク値）をTable 9に、その標準偏差をTable 10に示した。DEP, DBP, DEHPは3機関のいずれにおいても検出された。DPrP, DPeP, BBP, DEHA, DcHPは一部の機関において検出された。

Table 11に各機関における検出下限値(LOD)を示した。空試験で検出されるPhEについては、その標準偏差の3

倍を LOD1 とした。また GC/MS のクロマトグラムにおいて S/N=3 となる濃度を LOD2 とした。LOD1 及び LOD2 を比較して大きい方を LOD3 とした。LOD3 が各機関の当該期間内の検出下限値である。

### (3) 添加回収率

PhE の同一試料に対する添加回収率を Table 12 に示した。3 機関の平均で 77.7 ~ 127.7% の結果が得られた。

### (4) 検出値

各機関における同一試料からの PhE 検出量を Table 13 に示した。共通して検出されたのは 4 種類であった。このうち BBP, DEHA, DEHP の検出量は変動係数 10% 以下であり、3 機関の検出値はよく一致した。DOP 検出量は 3 機関間に差があったが、この化合物の検出量は小さく、標準偏差は機関 B の検出下限値 (0.5ng/g) と同程度であった。DEP と DBP は空試験において検出される化合物であり、機関 A と C においては空試験値のばらつきの範囲内であるため不検出になった。機関 C では空試験値が低いために検出された。

## 3. 弁当・定食調査結果

### (1) 調査対象試料

調査対象とした弁当及び定食の内容物や容器に関して Table 14 及び 15 に示した。弁当は幕の内弁当またはそれに類する内容のものを調査した。定食は、米飯・肉または魚・野菜・汁物を

含む献立のものを調査した。

### (2) 操作ブランク値及び検出下限値

弁当及び定食の分析は機関 C において行った。その期間中の 16 試行の操作ブランク値の平均は、Table 16 に示した通り、定食中濃度に換算して DEHP が 2.7ng/g 相当、DBP が 3.8ng/g 相当であった。他に DEP, BBP, DEHA, DOP が 0.1 ~ 0.2ng/g 相当検出された。(弁当ではブランク値も LOD も定食の 2 倍になる)。

### (3) 弁当及び定食からの検出量

Table 17 及び 18 に示したとおり、市販弁当においても定食においても DEHP が他の化合物より高い濃度で検出された。市販弁当からは 803 ~ 8930 ng/g、平均 4420ng/g の DEHP が検出されたのに対し、定食中の検出量は 12 ~ 304ng/g、平均 68ng/g であった。市販弁当はその他のフタル酸エステル類及び DEHA も検出量が高かった。

### (4) 一食当たりの PhE 摂取量

Table 19 及び 20 に、市販弁当及び定食を食べた場合の PhE 摂取量 (計算値) を示した。不検出とした PhE については、検出下限値の 20% を含有しているものと仮定して計算した。

## 4. 病院給食調査結果

### (1) 調査対象試料

今回調査対象とした病院食の献立を Table 21(1-3) に示した。各病院とも調理はほとんど自施設で行っている。V