

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

業務用食品包装材フィルムの*n*-ヘプタン溶出化合物の各種クロマトグラフィー
による5画分の分取

分担研究者 片瀬隆雄・上田眞吾 日本大学生物資源科学部

研究要旨：組換え酵母を用いて内分泌攪乱物質を検索したところ、プラスチック製品の業務用食品包装用ラップフィルム、学校給食用手袋、オモチャの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出されたが、3種類の食品包装用ラップフィルムのなかで活性の度合いが異なっていた。相対的に強度な活性を有していたラップ溶出物中には、ガスクロマトグラム上に表れた5ピークから少なくとも5種化合物で、質量分析計で*n*-hexyl, *n*-octyl 及び *n*-decylの5種以上のアジピン酸エステル混合物が含まれることが明らかにされた。そこで、混合物のどの部分にエストロゲン活性があるのかを明らかにする目的で、各成分を薄層クロマトグラフ及びガスクロマトグラフで分離し、質量分析計及び核磁気共鳴スペクトル計で同定後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)で5画分を分取した。

1. 研究目的

市販食品に包装されていた乗務用ラップを回収し、ガスクロマトグラフィー／ガスクロマトグラフ質量分析計でラップから潜在的に溶出する化合物を同定し、その化合物種によって約100枚のラップがA, B, C, D及びMの5種に分類されることが分かった¹⁾。これらの中で、主な3種のA～Cラップから*n*-ヘプタン溶出物を組換え酵母系培養によるエストロゲン活性をスクリーニングを行ったところ、Bラップ（試料R40）溶出物が他より活性を有することが明らかになった²⁾。この溶出物中には、ガスクロマトグラム上に表れた5ピークから少なくとも5種化合物で、質量分析計で*n*-hexyl, *n*-octyl 及び *n*-decylの5種以上のアジピン酸エステル混合物が含まれることが明

らかにされた¹⁾。そこで、混合物のどの部分にエストロゲン活性があるのかを明らかにする目的で、各成分を薄層クロマトグラフ(TLC),及びガスクロマトグラフ(GLC)で分離し、質量分析計(MS)及び核磁気共鳴スペクトル計(NMR)で同定後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)で5画分を分取することができた。

2. 方法

相対的に活性が強度であった業務用ラップ(R40)は、質量分析計による解析の結果、市販のアジピン酸*n*-アルキル(和光純薬, 045-24332)と同一であることが分かった。そこで、ラップ(R40)溶出物に代えて、市販品を分取することとした。本分離・分取操作の概略を図1に示す。また、操作及び分析条件を以下に示す。

TLC：シリカゲル上で混合溶剤（メタノール：5%硫酸=95：5）で展開。

GLC：一定のカラム温度（100 °C for 2 min ~280 °C at 10°C/min for 15min）のカラムULBON HR-1(25mx0.25mm,id,0.25µm 層厚)中を、一定のヘリウム流速（28.7 cm/sec）で走行。FID検出器。

HPLC：Capcell Pak C-18充填カラム（250mmx10mmid）中を、95%メタノールが一定の流速流厚（3ml/min,4.3Mpa）で走行。

UV225nm 及び至差屈折率（RI）検出器。

MS：JEOL GC mate装置のdirect probe inlet 法で注入し,EI イオン化法で測定。

NMR：¹H及び¹³C-NMRスペクトルはJEOLGSX-400 装置で溶媒CDCl₃ 中でTMSを内標準として測定。

3. 結果及び考察

業務用ラップ（R40）溶出物のGCクロマトグラムとMSスペクトルを図2に示す。

また、業務用ラップ（R40）溶出物と市販試薬アジピン酸*n*-アルキル（和光純薬, 045-24332）のGCクロマトグラムを図3に示す。クロマトグラムからラップに使用されたものが試薬アジピン酸*n*-アルキルであると判断し、以下の単離に同試薬を用いた。

TLCで、順相展開は不分離だったので、逆相展開剤として5%硫酸/メタノール混合液のメタノール95,98,100%で試みたが95%メタノールが最適であった。同試薬のGLC及びHPLCクロマトグラムを図

4に示す。

各クロマトグラムに示されるような5成分を含む試薬混合物約0.5gから、HPLCで単離した結果、図1に示すAdp-6-2 ~ Adp-6-6の5成分をそれぞれ単離分取した。混合物中の各成分が十分に単離されていることをGC, MS及びNMRで確認した。Adp-6-2の例を図5に示す。単離した各成分のMSおよびNMRの化合物同定の確認データを表1に示す。

今後、単離した各成分の組換え酵母系および乳癌細胞系によるエストロゲン活性の検出を試みる予定である。また、組換え酵母系検出法で、nonylphenol混合物に活性があるにもかかわらず、純品の*n*-nonylphenolに活性が見られない実験結果を得ている²⁾。本法を、nonylphenol混合物中の化合物の単離分取に応用する計画である。

文献

¹⁾片瀬隆雄・金倫碩：ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法による業務用包装材プラスチックフィルムから潜在的に移行するアジピン酸エステルの定量。分析化学48:649-655 (1999)

²⁾井上正：組換え酵母検出系による日常生活用品中のエストロゲン様活性の分析。本（分担）研究報告書。表2, 図1。(2000)

表1 分離画分のEI-MS及び¹³C-NMRの結果

画分	同定	M	MS	¹³ C-NMR
Adp-6-2	DHexA (din-C ₆)	C ₁₈ H ₃₄ O ₄ (M=314)	m/z314.3(M ⁺), 231.2 231.2 129. (base peak)	175.39, 64.46, 33.92, 31.38, 28.54, 25.54 24.4, 22.48, 3.94
Adp-6-3	HexOA (n-C ₆ &C ₈)	C ₂₀ H ₃₈ O ₄ (M=342)	m/z342.3(M ⁺), 259.2 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃ O+H ₂ O) 241.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₃ O) 231.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O+H ₂ O) 213.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O) 129. (base peak)	173.39 (C=Ox2) 64.5(COOCH ₂ -2), 33.93(CH ₂ COOx2), 31.74, 31.39, 29.17, 29.14, 28.59, 28.56, 25.89, 25.55, 24.41(CH ₂ CH ₂ COO-x2), 22.59, 22.49, 14.4, 13.95
Adp-6-4	HexOA & di-C ₈ (n-C ₆ &C ₈)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ (M=342)	m/z370.3(M ⁺), 287.2 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃ O+H ₂ O) 269.2 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃ O) 241.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O+H ₂ O) 223.3 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O) 213.2 (M ⁺ -C ₁₀ H ₂₁) 129. (base peak)	173.37 (C=Ox2) 64.49(COOCH ₂ -x2), 33.92(CH ₂ COOx2), 31.85, 31.39, 29.48, 29.26, 29.21, 29.17, 29.69, 28.56, 25.89, 25.55, 24.41(CH ₂ CH ₂ COO-x2), 22.64, 22.49, 14.4, 13.94
Adp-6-5	ODA (n-C ₈ &C ₁₀)	C ₂₄ H ₄₆ O ₄ (M=398)	m/z398.3(M ⁺), 287.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O+H ₂ O) 269.2 (M ⁺ -C ₈ H ₁₇ O) 259.2 (M ⁺ -C ₁₀ H ₂₁ O+H ₂ O) 241.2 (M ⁺ -C ₁₀ H ₂₁ O) 129. (base peak)	173.46 (C=Ox2) 64.57(COOCH ₂ -2), 33.98(CH ₂ COOx2), 31.94, 31.79, 29.54, 29.53, 29.31, 29.26, 29.19, 28.64(x2), 25.93(x2), 24.47(CH ₂ CH ₂ COO-x2), 22.69, 22.65, 14.11, 14.10
Adp-6-6	DDA (di-C ₁₀)	C ₂₆ H ₅₀ O ₄ (M=426)	m/z426.4(M ⁺), 287.2 (M ⁺ -C ₁₀ H ₂₁ O+H ₂ O) 269.2 (M ⁺ -C ₁₀ H ₂₁ O) 129. (base peak)	173.46, 64.57, 33.99, 31.9, 29.54, 29.53 29.31, 29.26, 28.65, 25.94, 24.47, 22.69, 14.11

試料 (WAKO 045-24332:n-C₆.s.10)

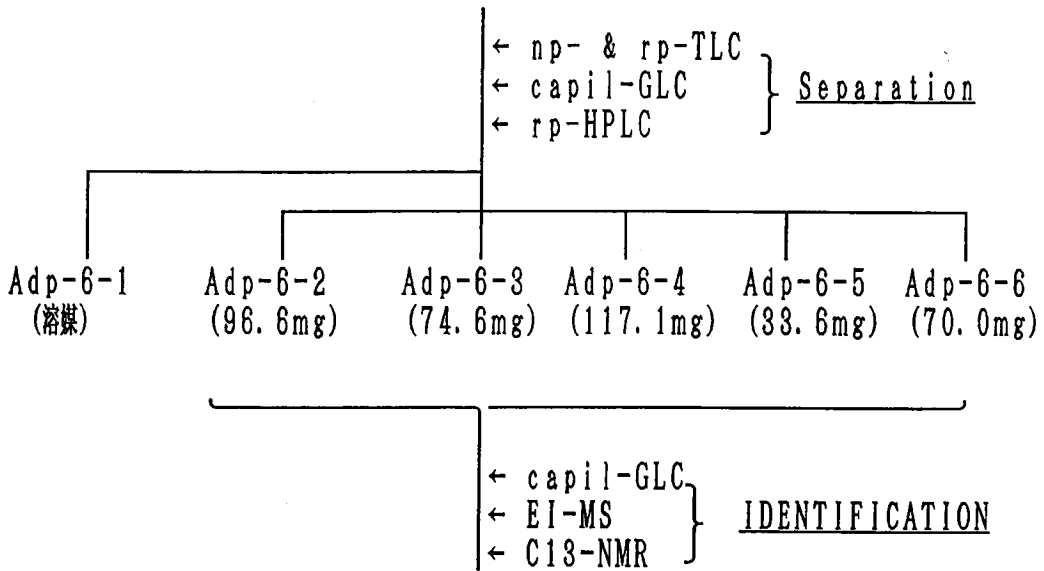


図1：業務用食品包装材ラップ（R40）添加成分アジピン酸エステルの分離と同定手順

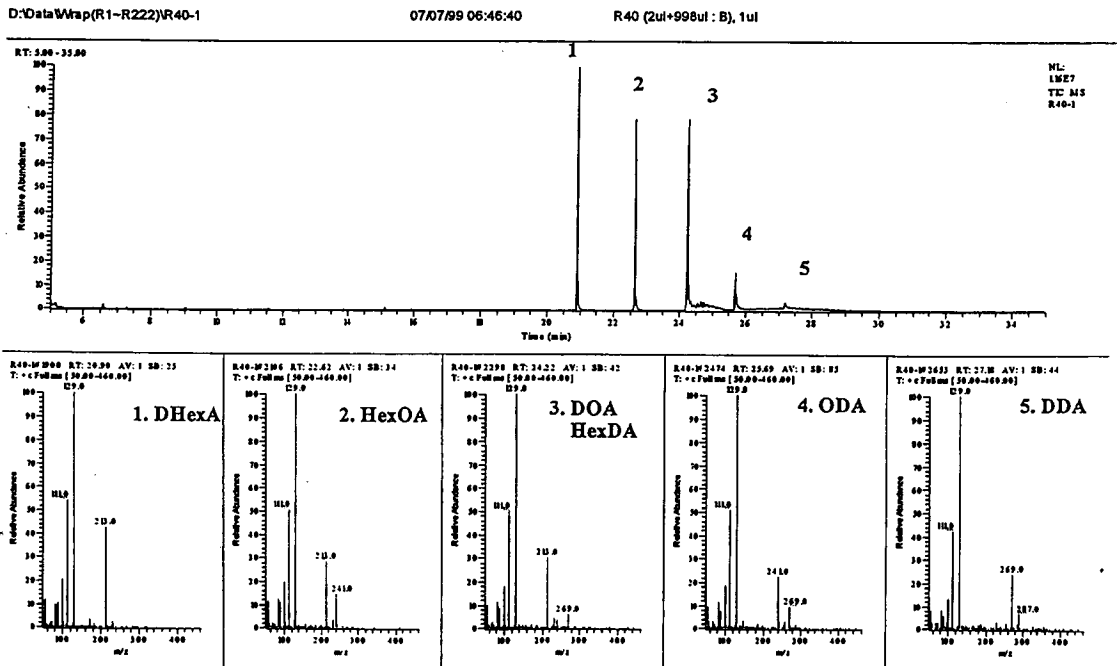


図2：業務用食品包装材ラップ（R40）溶出物のGCクロマトグラム及びマススペクトル

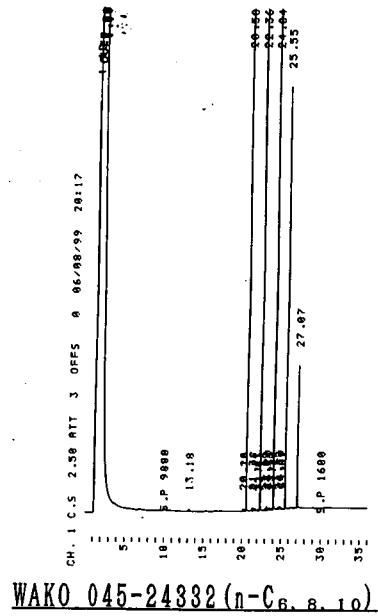
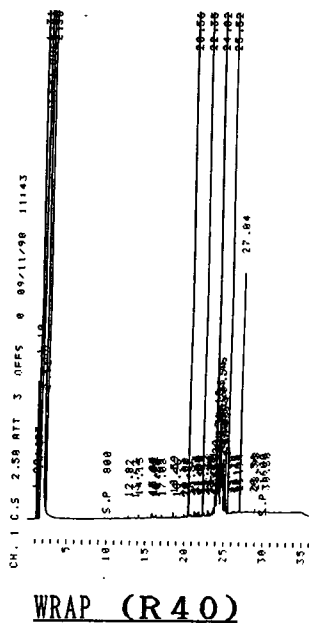


図3：業務用食品包装材ラップ（R40）溶出物と市販薬品アジピン酸n-アルキルの比較

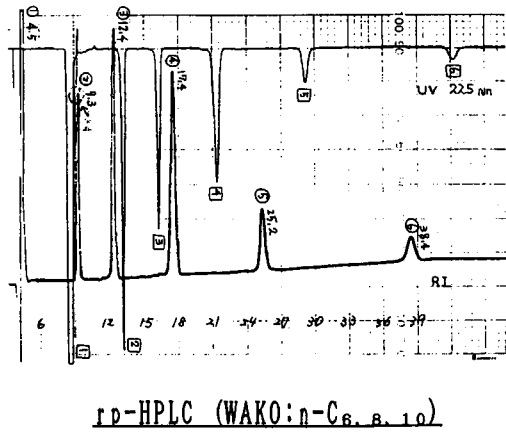
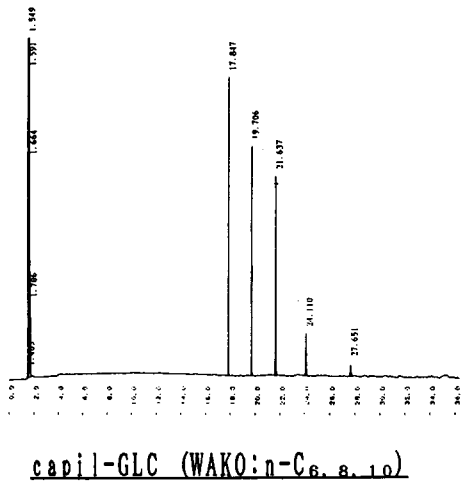
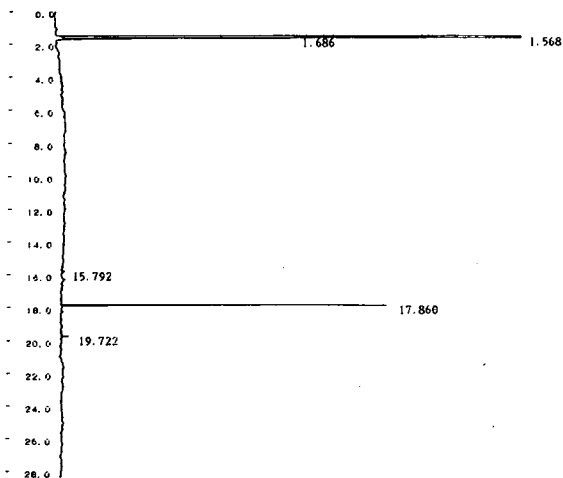
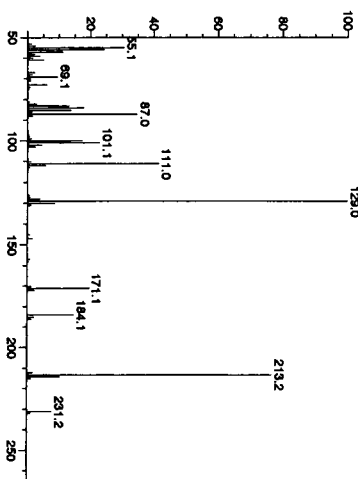


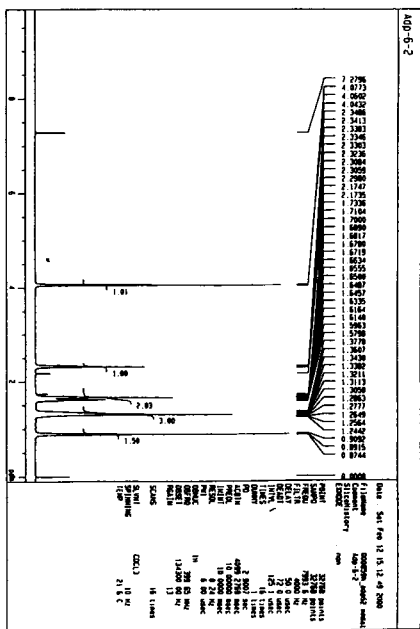
図4：市販薬品アジピン酸n-アルキルのGLC及びHPLCクロマトグラム



capil-GLC



EI-MS



C13-NMR

[Adp-6-2]

図5：市販薬品アジピン酸n-アルキルの5成分中 Adp-6-2画分のGLC, HPLC及びNMR