

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び  
動態研究

### 食品用ラップフィルム中における 4-ノニルフェノールの分析及びその動態解明

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

研究協力者 吉村吉博 星薬科大学

井之上浩一 星薬科大学

加藤嘉代子 星薬科大学

牧野恒久 東海大学

岩崎克彦 東海大学

和泉俊一郎 東海大学

#### 研究要旨

食品用ラップフィルムに内分泌系をかく乱することが示唆される化学物質の残存に関して注目され、その安全性を評価する必要がある。特に内分泌かく乱作用が指摘されている 4-ノニルフェノールが残存している報告があり、早急に調査研究を実施しなければならない。そこで食品用ラップフィルム中に残存する 4-ノニルフェノールに関する分析法の開発、溶出挙動の解明、改良型ラップフィルムの評価及びそのエストロゲン活性評価を実施した。

#### A. 研究目的

4-ノニルフェノール（NP）は、酸化防止剤（Tris (nonylphenyl) phosphite）や界面活性剤（Nonyl ethoxylates）等の分解物として、プラスチック製品に残存する可能性が示唆される。近年、その用途よりスーパーや一般家庭等で広く利用されている食品用ラップフィルムもその一つとして挙げられる。最近の報告で、ポリ塩化ビニル製品に最高 5、500 μg/g の残存が確認されている<sup>1)</sup>。内分泌かく乱化学物質として、代表的な化学物質である NP に関して、食品用ラップフィルム中残存や食品移行等調査しなければならない。そこで、NP に関しての新規分析法の開発及び食品用ラップフィルムを用いて、材質試験及び溶出試験を実施した。近年、開発された改良型ラップフィルムに関し

てもその調査研究を実施し、エストロゲン活性評価も行った。

#### B. 研究方法

##### B・1 試薬・試料

NP は環境分析用試薬（関東化学社製）を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒はシクロヘキサン（残留農薬試験用；関東化学社製）、2-プロパノール（HPLC 用；関東化学社製）、n-ヘプタン（残留農薬試験用；和光純薬社製）、メタノール（残留農薬試験用；和光純薬社製）を、精製水には日本ミリポア社製 Milli-Q（EDS ポリッシャー付き）で製したものをを用いた。移動相のアセトニトリル、リン酸はいずれも和光純薬社製、試薬特級を使用した。

NP はメタノールに溶解して 1.0 mg/ml の標準液を調製し、標準液を更にメタノール/水

(1/1 : V/V) で各種濃度に調製し、実験に供した。

また、測定試料として、業務用ラップフィルム 12 検体及び一般用ラップフィルム 18 検体の合計 30 検体。そのうち、ポリ塩化ビニル製ラップフィルムは 22 検体、ポリ塩化ビニリデン製ラップフィルムは 3 検体、ポリエチレン製は 3 検体、ポリプロピレン製が 1 検体、ポリオレフィン製が 1 検体 (Table 1)。

#### B・2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフとしてポンプ、恒温槽には日立社製 L-6300、ESA 社製 Column Heater、電気化学検出器(ED)は ESA 社製 Coul Array MODEL 6210、データ処理は Coul Array System Win 32 を用いた。試料注入には Kontron Instruments 社製 Autosampler 460 を用いた。分離カラムには資生堂製 CAPCELL PAK UG 120 C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm)を使用した。

実験に用いるガラス器具はすべてメタノール洗浄後、200 、4 時間加熱して使用した。

#### B・3 測定条件

カラム温度を 40 とし、移動相にアセトニトリル/0.5 %リン酸水溶液(65/35)を 1.0 ml/min で送液した。また、ED の各電圧は、NP に特異的かつ高感度検出が可能となるように設定した。試料注入量を 50 µl とした。各試料の LC 測定毎にメタノールを注入してブランクのモニタリングを行った。

#### B・4 材質・溶出試験及び食品移行について

材質試験<sup>1, 2)</sup> : ハサミで細片にした試料 0.5 g を精秤し、シクロヘキサン/2-プロパノール (1/1) 混液 10 ml を加え、室温で一昼夜放置後、この抽出液 1.0 ml を濃縮乾固した。その後、メタノール 5 ml で再溶解させ、メ

ンブランフィルター(0.45 µm)でろ過したものを試験溶液とした。

溶出試験 : 試料が 5×5 cm<sup>2</sup> になるようにハサミで切り取り、それを n-ヘプタン 25 条件下 60 分間放置した。抽出溶媒を濃縮乾固させた後、メタノールに再溶解させ、メンブランフィルター(0.45 µm)でろ過したものを試験溶液とした。また、他の溶出条件としては、水、60 、30 分を実施した。本溶媒は、そのまま測定用試験溶液とした。

食品移行 : 本研究では、抽出等が容易である米食品(おむすび)を用いて、各種条件下で食品移行を検討した。

#### B・5 エストロゲン活性評価法

被検体測定には、和光純薬社製環境分析用 Estrogen-R( ) Competitor Screening Kit を用いた。また、測定機器(蛍光リーダー)には、TECAN 社製 SPECTRA Fluor Plus を使用し、測定を実施した。

NP 及びエストラジオール標準液は、DMSO に溶解して 10<sup>-2</sup> M の標準液を調製し、標準液を更に DMSO で各種濃度(10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-10</sup> M)に調製し、試料溶液とした。テストチューブに、114 µl の反応溶液と 6 µl の試料溶液を混合して ER 固相化マイクロプレートにこの溶液を 100 µl 移行した。また、A1、A2 ウェルにはブランク溶液(DMSO 5 µl + 反応溶液 95 µl)の混液を添加した。2 時間放置後、規定の洗浄液で 2 回洗浄し、残り液を充分に取り除き、100 µl の測定溶液を添加して蛍光リーダーで測定を行った。蛍光リーダーの測定条件は、Ex. 485 nm、Em. 535 nm で検出条件を設定し、Gain:Optimal 及び Flash Number:100 で行った。

固相化 ER に結合している蛍光エストラジオール量を蛍光検出で測定し、その強度が

50 %置換された時の試料濃度を  $IC_{50}$  として各試料の ER 親和性を算出した。また、食品用ラップフィルム試料に関しては、材質試験用試料溶液を利用して、本実験に用いた。

## C. 研究結果

### C・1 LC/ED 測定条件の検討

#### C・1・1 移動相の検討

移動相には、アセトニトリル/リン酸水溶液を用い、リン酸濃度における検出感度の影響を検討した。NP のピーク面積と印加電圧をプロットしてハイドロダイナミックボルタモグラムを作成した(Fig.1)。その結果、高い感度が得られた0.5 %リン酸水溶液を用いて以下の実験を行うことにした。

#### C・1・2 検量線の作成

NP をそれぞれ 1.0 ~ 1000 ng/ml に調製し、その 50  $\mu$ l を注入して、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。その結果、検出限界は 1.0 ng/ml (絶対量として 50pg、S/N=3) であった。検量線は 5 ~ 1000 ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数=0.998) が得られた。Fig.2 に NP 標準品のクロマトグラムを示す。

#### C・1・3 実験用精製水における NP 汚染に関する検討

実験用に使用する水精製システムは各種プラスチックを利用しているため、NP 等のアルキルフェノール類汚染が懸念される。そこで、新規アルキルフェノール類及びビスフェノール A の水試料に関する分析法を構築し、実験用に利用する精製水中残存化学物質の測定を実施した。

その結果、従来利用していた Milli-Q REGENT WATER SYSTEM により、精製された実験用水では、NP(0.03 ng/ml)及びビスフェノール

ール A(0.05 ng/ml)が検出された。しかし、内分泌かく乱化学物質や有機揮発性化学物質測定用として、新たなシステムである Milli-Q gradient A10 Elix with EDS polisher system により、精製された実験用水においては、いずれの化学物質に対して、検出限界以下 (ND<0.01 ng/ml;ビスフェノール A 及び ND<0.02 ng/ml;NP) であった。

本実験においては、Milli-Q gradient A10 Elix with EDS polisher system で精製された実験用水を用いて、実施した。

#### C・2 材質試験

上記の条件において、試験溶液を LC-ED で測定した結果、試料中の残存量が 2000  $\mu$ g/g 以上であったのが 1 検体、1900 ~ 1500  $\mu$ g/g の範囲であったのが 1 検体、1400 ~ 1000  $\mu$ g/g の範囲であったのが 6 検体、900 ~ 500  $\mu$ g/g の範囲であったのが 3 検体の検出であった (Table.2)。材質による違いは、ポリ塩化ビニル製のみから NP の残存が確認された。また、用途別による違いは、業務用 (9/12) 及び一般用 (2/18) の検出を得た。

#### C・3 溶出試験

上記の条件下で実験を実施した結果、n-ヘプタンでの溶出試験では、1.6 ~ ND(<0.1)  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> の溶出量であった (11/30)。また、水の溶出試験では、37.5 ~ ND(<1.0) ng/cm<sup>2</sup> の溶出量であった (10/30) (Table.3)。

#### C・4 改良型ラップフィルム中残存 NP の分析

NP の残存が確認されたラップフィルムの新規改良型が開発され、そのラップフィルム中に残存する NP を材質試験により、調査した。その結果、改良型では NP の残存は確認されなかった(Fig.3)。

#### C・5 食品移行に関する検討

食品用ラップフィルム (4 検体) におむす

びを包み、室温 30 分及び電子レンジ 1 分の条件下において、おむすびへの移行を検討した。測定対象は、ラップフィルムと接している表面部位及び全体の平均を換算して移行量を検討した。その結果は、Table 4 に示す。

#### C・6 食品用ラップフィルムのエストロゲン活性に関する評価

Estrogen-R ( ) Competitor Screening Kit を利用して、食品用ラップフィルムのエストロゲン活性評価を実施した。本法を用いて、標準化学物質( NP 及びエストラジオール) を評価した際、Fig.4 のように活性が確認され、標識エストラジオールとの競合が確認された。つまり、本法を用いることにより、エストロゲン受容体( )との結合能が確認できる。

食品用ラップフィルム中残存物質がエストロゲン受容体との結合性を有するかの確認を実施した。その結果、NP の残存量との相関性が確認された(Fig.4)。

#### D. 考察

NP の分析として LC/ED を用いることにより、高感度かつ選択的測定法を確立できた。この方法は、食品や生体試料への応用も可能であると思われる。

食品用ラップフィルムの NP 残存量の実態調査より、ポリ塩化ビニル製ラップフィルムより高い比率で検出された。また、材質試験に残存がみられたものは、各種溶媒による溶出が確認され、食品への移行が懸念される。また、溶出試験の結果から、脂溶性食品への移行のしやすいことが懸念される。

業界側の対応として NP の残存を減少された食品用ラップフィルムへの生産切り替えの実施を始めた。改良後と思われる生産ロッ

トは、NP の残存量も減少していることが判明した。しかし、切り替え後のラップフィルムでは、NP の代用添加剤等として内分泌かく乱作用を有する化学物質を利用していた場合、NP 残存量の調査のみでは、十分な評価法とは言い難い。そこで、新規評価法の基礎的検討として、残存添加剤の内分泌かく乱作用を総合的に評価する測定法の開発が望まれる。

エストロゲン活性評価法として、今回エストロゲン受容体バインディングアッセイ法を利用して、ラップフィルム材質試験溶液を希釈し、プレートに添加することにより、良好なエストロゲン受容体に対する競合反応が確認され、本法をさらに発展させ、総合的評価法として確立が可能と推測される。また、本法を用いて、従来型及び改良型のラップフィルムのエストロゲン受容体結合能を比較した際、NP 残存量との相関性が確認された。改良型のラップフィルムでは、そのエストロゲン受容体結合能がないことも示唆された。

#### E. 結論

NP の残存及び溶出に関しては、酸化防止剤として添加されたトリスノニルフォスファイトの分解によるものと思われる。この酸化防止剤は、主にポリ塩化ビニル製ラップフィルムに添加されているものと推定される。業務用ラップにポリ塩化ビニル製が多く利用しているため、その残存率が高かったものと推定される。一方、業界の対応としてこれらの酸化防止剤の使用を制限し、NP の溶出を抑えたラップフィルムに製造・販売の切り替えを始めている。つまり、改良されたラップフィルムに関しては、NP 溶出がほとんどないこともと考えられ、今後はこれらの製品が市場に出てくると推定され、業界の NP 残存に

対する問題に対する対応は、良好な結果と思われる。しかし、その一方で可塑剤やその酸化防止剤の代用品に対しては、今後注意していく必要性があり、今回応用した単一化学物質の評価のみではなく、総合的化学物質評価法の確立が望まれる。

#### 参考文献

- 1) 河村ら；食衛誌 40.274 (1999)
- 2) 河村ら；食衛誌 40.189 (1999)

#### 学会発表

第6回日本食品化学学会総会・学術大会；「食品用ラップフィルム中ノニルフェノールの分析とその実態」(2000)；井之上浩一、近藤幸子、矢島功、加藤嘉代子、中澤裕之(星薬大)、堀江正一(埼玉県衛生研究所)、平山クニ(神奈川県衛生研究所)

#### 発表論文

- 1) K. Inoue、 Y. Yoshimura、 H. Nakazawa et al. "Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by LC-ED." Analyst、 125、 1959-1961(2000)
- 2) K. Inoue、 S. Kondo、 Y. Yoshimura、 M. Horie、 H. Nakazawa、 et al. "Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods." Food Addit. Contam. (in press、 2001)
- 3) K. Inoue、 Y. Yoshie、 Y. Yoshimura、 H. Nakazawa、 et al. "Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples by LC-ED." J. Chromatogr. A (投稿中)