

GC/MS による食品中のスチレンダイマー及びトリマーの分析法

鈴木 仁*, 田端節子*, 貞升友紀**, 下井俊子*, 斉藤和夫*

Analytical Method for Styrene Dimers and Trimers in Foods by GC/MS

Jin SUZUKI*, Setsuko TABATA*, Yuki SADAMASU**, Toshiko SHIMOI* and Kazuo SAITO*

An analytical method for 4 styrene dimers and 6 trimers in foods by GC/MS was developed. Dimers and trimers were extracted with acetone, added to a 10% sodium chloride solution and extracted with *n*-hexane. If an extract contained oil, it was defatted with acetonitrile saturated with *n*-hexane. The extract was then evaporated and purified using a Florisil column. Dimers and trimers were analyzed by GC/MS using fluorene-*d*₁₀ as the internal standard. The recoveries of dimers and trimers spiked in samples at the level of 25 ng/g were over 70% and the coefficient of variation was below 5%. The limit of quantification was 5 ng/g.

Keyword : スチレンダイマー styrene dimer, スチレントリマー styrene trimer, 食品 food, ガスクロマトグラフ/質量分析計 GC/MS

緒言

スチレンダイマー(以下 SD)及びトリマー(以下 ST)は、各種食品容器に使用されるポリスチレンの製造過程で生成し、製品中に存在する。この SD 及び ST が、加熱によって食品容器から食用油脂中に微量ではあるが溶出することが知られている¹⁻³⁾。

近年、農薬、工業関連物質及び燃焼生成物の一部がエストロゲン様の作用を持つことが明らかにされ、これらの化合物によって動物の内分泌系に影響の及ぶことが懸念されている。この SD 及び ST は平成 12 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において「リスクが低く今後行政施策としての試験は行わないが、今後研究的・学問的に追求していくこと」とされている。しかし、環境庁が 1998 年に当初公表した内分泌攪乱作用を有すると疑われる 67 化合物には、この SD 及び ST が含まれていた⁴⁾。

環境庁から、底質及び生物質試料について、それらに含まれる SD 4 種[1,3-ジフェニルプロパン(以下 DPP), *cis*-1,2-ジフェニルシクロブタン(以下 *cis*DPCB), *trans*-1,2-ジフェニルシクロブタン(以下 *trans*DPCB), 2,4-ジフェニル-1-ブテン(以下 DPB)]及び ST 6 種[2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン(以下 TPH), 1a-フェニル-4a-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン(以下 aPaPET), 1a'-フェニル-4e-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン(以下 aPePET), 1e-フェニル-4a-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン(以下 ePaPET), 1e'-フェニル-4e-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン(以下 ePePET),

1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン(以下 TPCH)]の分析法のマニュアル(以下環境庁マニュアル)が公表されているが⁵⁾、食品試料については分析法が設定されていない。また、食品の容器包装試料については、いくつかの報告があるが⁶⁻⁸⁾、食品試料については、カップ麺のみの報告であり、対象となる化合物も限られ、容器からの溶出が少ない DPP や TPCH は分析対象となっていない^{2,9)}。著者らは、環境庁マニュアルを参考に DPP 及び TPCH を含めた 10 種の SD 及び ST の各種食品に対応できる分析法を検討した。

実験方法

1. 試料

イモ類、穀類、食用油脂、緑黄色野菜、カレールの各々をホモジナイズしたものを使用した。

2. 試薬

標準物質：DPP, *cis*DPCB, *trans*DPCB, DPB, TPH, aPaPET, aPePET, ePaPET, ePePET, TPCH：和光純薬工業(株)製環境分析用標準品

内標準物質：フルオレン-*d*₁₀(以下 Flu)：和光純薬工業(株)製環境分析用標準品

アセトン, *n*-ヘキサン, アセトニトリル, ジエチルエーテル, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製残留農薬分析用

フロリジル：Florisil PR(和光純薬工業(株)製)を 130 で 15 時間加熱後、透明すり合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓してデシケーター中で室温まで冷却したもの。

水：超純水製造装置 Milli-Q SP TOC で製造した超純水

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

** 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

(比抵抗値 18 M · cm 以上)を EDS ポリッシャー(日本ミ
リポア(株))を通過させたもの。

3. 装置

ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS): ガスクロマト
グラフ GC-17, 質量分析計 GCMS-QP5000, 以上(株)島津
製作所製

4. GC / MS 測定条件

カラム: DB-5MS(0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μm) J
& W Scientific 社製

カラム温度: 40 (1 min) 10 /min 300 (30 min)

注入口温度: 250, インターフェイス温度: 230,

キャリアーガス: He(100 kPa), 注入量: 1 μL,

注入方法: スプリットレス方式, 測定モード: SIM,

定量イオン(確認イオン)

DPP(MW 196.3) : 92(196),

cisDPCB(MW 208.3) : 104(208),

transDPCB(MW 208.3) : 104(208),

DPB(MW 208.3) : 91(208),

TPH(MW 312.4) : 91(207),

aPaPET(MW 312.4) : 129(207),

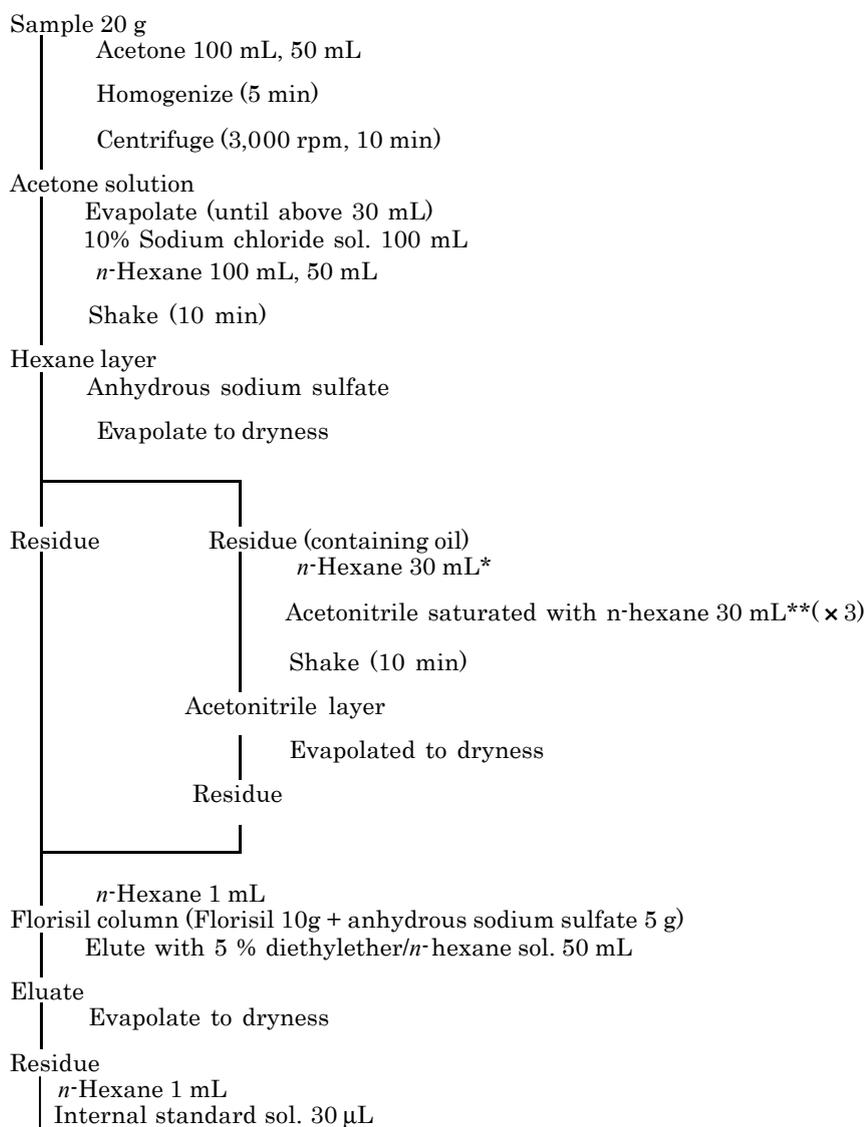
aPePET(MW 312.4) : 129(207),

ePaPET(MW 312.4) : 129(207),

ePePET(MW 312.4) : 129(207),

TPCH(MW 312.4) : 104(312),

Flu(MW 176.3) : 176



GC/MS

*: Fifty mL of *n*-hexane was used in the case of the sample of cooking oil.

** : Fifty mL of acetonitrile saturated with *n*-hexane was used
in the case of the sample of cooking oil.

Fig.1. Schematic Diagram for Determination of Styrene Dimers and Trimers in Foods

5. 標準溶液及び内標準溶液の調製

1) 標準溶液 各標準物質 10 mg を精秤し, 各々別々に *n*-ヘキサンを加えて溶解し, 正確に 100 mL として標準原液とする(標準原液 1 mL 中に標準物質 100 µg を含む). 各標準原液 5 mL を混合し, *n*-ヘキサンを加えて溶解し, 正確に 100 mL として標準混合溶液とする(標準混合溶液 1 mL 中に各々標準物質 5 µg を含む).

2) 内標準溶液 Flu 100 mg を精秤し, *n*-ヘキサンを加えて溶解し正確に 100 mL として内標準原液とする(内標準原液 1 mL 中に Flu 1,000 µg を含む). 内標準原液 10 mL をとり, *n*-ヘキサンを加えて溶解し正確に 100 mL として内標準溶液とする(内標準溶液 1 mL 中に Flu 100 µg を含む).

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は, Fig. 1 に示したように行った.

1) 試料からの抽出 試料 20 g をブレンダーカップにとり, アセトン 100 mL を加え 5 分間ホモジナイズした後, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離後上清を分取した. 残さにアセトン 50 mL を加えて再度抽出し, 先のアセトン抽出液と合わせた. このアセトン抽出液を約 30 mL まで減圧留去後, 分液ロートに移し 10 %塩化ナトリウム溶液 100 mL 及び *n*-ヘキサン 100 mL を加えて 10 分間振とう後, *n*-ヘキサン層を分取した. さらに水層に *n*-ヘキサン 50 mL を加えて再度抽出し, 先のヘキサン抽出液と合わせた. このヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後, ガラスワールでろ過し, エバポレーターで減圧乾固し残留物を得た. 食用油脂やカレーなど残留物に油脂を含む場合には, ヘキサン/アセトニトリル分配を行った. 油脂を含まない場合には省略し, *n*-ヘキサン 5 mL に溶解しカラム精製用試料溶液とした.

2) ヘキサン/アセトニトリル分配 残留物を *n*-ヘキサン 30 mL に溶解して分液ロートに移し, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 10 分間振とう後, アセトニトリル層を分取した. ヘキサン層にさらに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて同様の操作を 2 回行い, アセトニトリル層を合わせた. アセトニトリル層はエバポレーターで減圧乾固後, *n*-ヘキサン 5 mL に溶解しカラム精製用試料溶液とした. なお試料が食用油脂の場合には, 残留物に *n*-ヘキサン 50 mL を加えて溶解し, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL で抽出した.

3) カラム精製 直径 1.5 cm のカラム管(底部にガラスフィルター付き)にフロリジル 10 g を湿式充てんした後, 無水硫酸ナトリウム 5 g を積層した. これにカラム精製用試料溶液を加え, 5 %ジエチルエーテル含有 *n*-ヘキサン溶液 50 mL で溶出した. カラム溶出液は減圧乾固後, *n*-ヘキサン 1 mL に溶解し, 内標準溶液 30 µL を加え試験溶液とした.

7. 定量及び確認

試験溶液は GC/MS により測定を行い, SD 及び ST と一致するピークについては Flu を内標準物質として定量した.

定量イオンにおいて SD 及び ST と保持時間が一致するピークが検出された場合には, 確認イオンの存在の有無により確認した.

結果及び考察

1. 試験溶液の調製

河村ら¹⁾, 山田²⁾らはカップ麺試料について, カップ麺 1 個全量(200 g 以上)を用いて分析を行っている. またポリスチレン容器から溶出された SD 及び ST は麺表層の油層に溶け込むことを想定し, *n*-ヘキサンで超音波処理による抽出方法が示されている. しかし, 他の食品試料では食品内部まで測定する必要があるため, 食品全体のホモジナイズによる抽出が必要であると考えられた. また試料量は 200 g であるため, *n*-ヘキサンによるホモジナイズ抽出では多量の溶媒を必要とし, 試料によってはエマルジョンを形成し, *n*-ヘキサン層との分離が非常に困難であった. そこで, 試料量を 20 g として, エマルジョンを形成しにくいアセトンで抽出し, 10 %塩化ナトリウム溶液を加え, *n*-ヘキサンに転溶する方法を試みた. その結果, *n*-ヘキサンのみでの抽出よりも操作が若干増えたものの, エマルジョンを形成することなく分離が容易であった. また環境庁マニュアルには脱脂の方法として, 底質試料等を 1 mol/L 水酸化カリウムエタノール溶液によるけん化後, *n*-ヘキサンで抽出する方法が示されている. この操作を油脂試料について応用したところ, けん化物が多量に生成し, 後の操作が非常に困難であった. そこで, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル分配による脱脂を試みた. その結果 3 回の分配操作で脱脂が可能であった. なおカラムによる精製は河村らの方法³⁾に準じて行った.

2. GC/MS 条件

環境庁のマニュアルには, 水質, 生物質及び底質試料を分析対象とした SD 及び ST の分離に 50% phenylmethylpolysiloxane を液相とするキャピラリーカラムを用いた定量法が示されている. また村橋は, 5% diphenyldimethylpolysiloxane を液相とするキャピラリーカラムを用いて, ディーゼル車排気ガスを試料とした分析を行っている¹⁰⁾. そこでカラムには J & W Scientific 社製の, 環境庁マニュアルに示されている DB-17, 村橋の報告に示されているものと同じ液相の DB-5MS, 無極性液相(dimethylpolysiloxane)の DB-1, 中極性液相(14% cyanopropylphenylmethylpolysiloxane)の DB-1701 及び極性液相(polyethyleneglycol)の DB-WAX の 5 種を用いて SD 及び ST の分離について検討を行った. その結果, DB-1 では 4 種の 1-フェニル-4-(1-フェニルエチル)テトラヒドロナフタレン(以後 PET)の分離が不十分であった. DB-5MS, DB-1701, DB-17 及び DB-WAX では 10 種の SD 及び ST の相互分離ができた. しかし DB-1701, DB-17 及び DB-WAX は PET の保持時間が長く, また耐用温度が低いことから分析には DB-5MS を使用することにした. DB-5MS を用いて 10 種の SD 及び ST 混合標準溶液を測

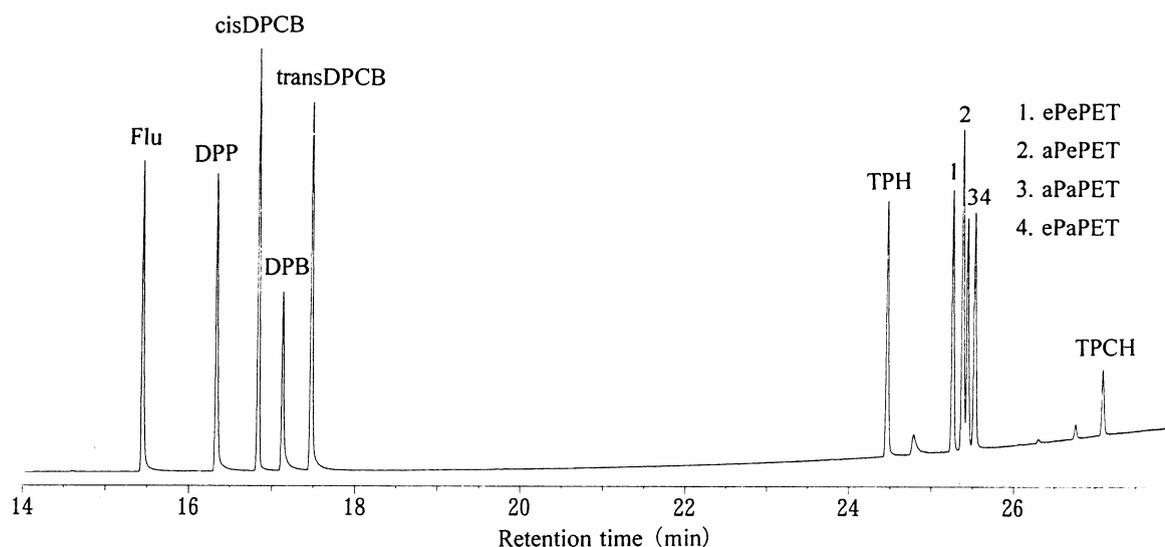


Fig. 2. SIM Spectrum of Styrene Dimers and Trimers

Column: DB-5MS, 0.25 mm i.d. × 25m, 0.25 μm thickness;

oven temperature: 40 (1 min) 10 /min 300 (30 min),

carrier gas: He (100 kPa)

Flu: fluorene-*d*₁₀, DPP: 1,3-diphenylpropane, DPB: 2,4-diphenyl-1-butene,

cisDPCB: *cis*-1,2-diphenylcyclobutane, transDPCB: *trans*-1,2-diphenylcyclobutane,

TPH: 2,4,6-triphenyl-1-hexene,

aPaPET: 1a-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphtharene,

aPePET: 1a-phenyl-4e-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphtharene,

ePaPET: 1e-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphtharene,

ePePET: 1e-phenyl-4e-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphtharene,

TPCH: 1,3,5-triphenylcyclohexane

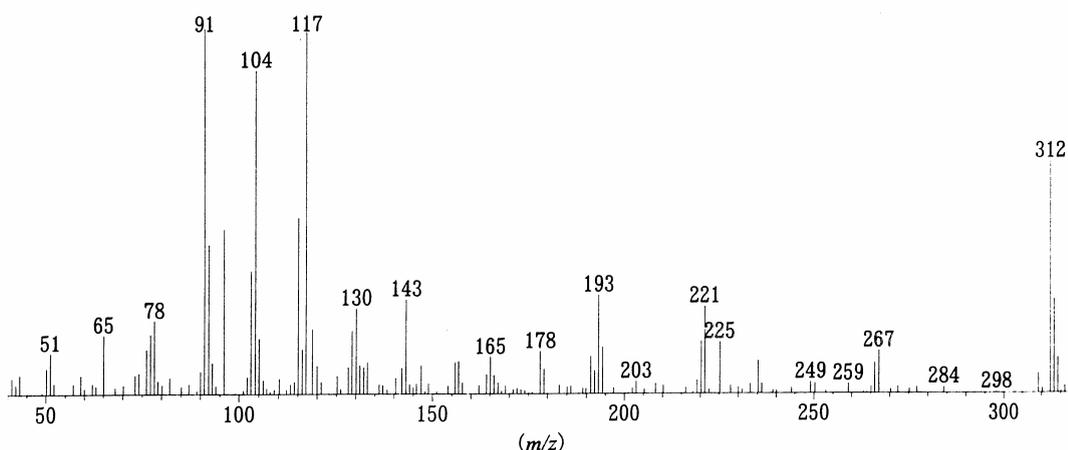


Fig.3. Mass Spectrum of TPCH

定した際のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。なお内標準物質として Flu を使用したときの検量線は、0.05 ppm ~ 5 ppm の範囲でそれぞれ良好な直線性を示した。

環境試料と比較して、食品試料はマトリックスが複雑である。SIM モードによる定量イオンのみでの GC/MS 分析では妨害物質による影響が懸念されることから、SCAN モードで測定した各化合物の質量スペクトルから複数の測定

イオンを選定した。SCAN モードで測定した結果、TPCH の質量スペクトルが既報⁶⁾に収載されているデータと若干異なることがわかった。Fig. 3 に示したように、*m/z* 312 に M⁺ の比較的強いピークが認められた。以上のことから、TPCH の確認イオンとして *m/z* 312 を使用し、その他のものについては環境庁マニュアルに示されたものを使用することにした。

3. 添加回収実験

試料 20 g に標準混合溶液 100 μ L を添加し(25 ng/g), 添加回収実験を行い, その結果を Table 1 に示した. 各化合物はおおむね 70%以上, CV 値も 5%以下と良好な結果

であった. しかし, 食用油脂では ST の回収率が 60%前後であった. 坂本らの報告³⁾では, アセトン抽出なしでサラダ油に添加した ST の回収率は 101 %であり, 本法はそれに比べて低い回収率であったことから 検討が必要である.

Table 1. Recoveries of Styrene Dimers and Trimers Spiked into Samples

Analyte	Recovery (%)				
	Potatoes	Grains	Cooking oil	Green vegetables	Curry roux
DPP	86.7 \pm 0.6	75.0 \pm 3.2	68.7 \pm 2.2	95.9 \pm 1.4	67.7 \pm 3.3
cisDPCB	89.5 \pm 1.4	79.9 \pm 3.4	73.7 \pm 1.7	91.3 \pm 1.3	69.8 \pm 3.0
transDPCB	91.1 \pm 1.1	79.8 \pm 3.3	68.3 \pm 2.1	92.6 \pm 1.1	69.8 \pm 3.2
DPB	90.6 \pm 2.8	81.6 \pm 3.6	82.0 \pm 3.8	103.5 \pm 4.6	96.8 \pm 3.0
TPH	86.6 \pm 2.0	84.1 \pm 0.9	68.4 \pm 2.7	90.6 \pm 0.4	75.2 \pm 3.7
aPaPET	85.3 \pm 1.6	76.6 \pm 1.6	57.5 \pm 2.3	87.3 \pm 0.4	70.1 \pm 3.9
aPePET	85.6 \pm 1.8	76.1 \pm 1.0	58.7 \pm 3.1	88.6 \pm 0.5	70.4 \pm 4.0
ePaPET	84.9 \pm 1.9	75.0 \pm 0.7	56.6 \pm 2.4	88.4 \pm 0.3	69.0 \pm 3.7
ePePET	87.1 \pm 1.5	78.0 \pm 1.5	64.1 \pm 3.2	90.8 \pm 0.4	72.1 \pm 4.6
TPCH	94.3 \pm 2.3	91.4 \pm 1.6	62.6 \pm 3.7	97.0 \pm 0.8	76.7 \pm 4.5

n=3; mean \pm standard division (%); spiked at 25 ng/g

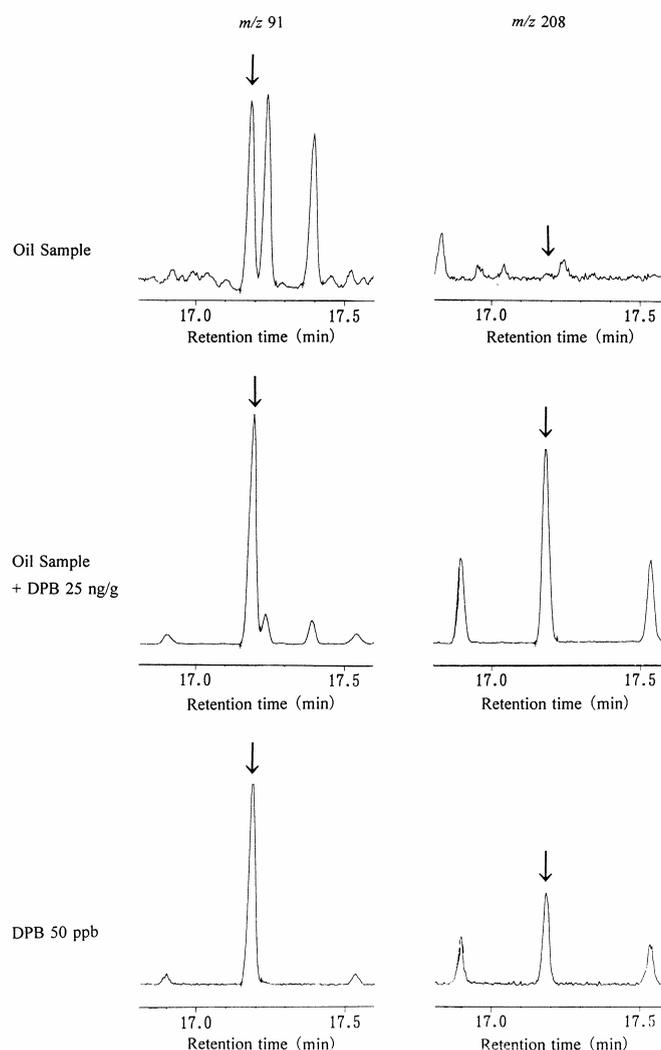


Fig. 4. SIM Spectra of DPB in Oil Sample

また、妨害となるピークはほとんどの試料で認められなかったが、油脂の定量イオン(m/z 91)においてDPBの保持時間付近にピークが認められた(Fig. 4)。そこで、確認イオンの m/z 208 で測定したところ、DPBと同じ保持時間付近にピークは認められなかった。このことから特に油脂試料については、確認イオン等による複数のイオンで確認する必要があると考えられた。なお、本法による各化合物の定量限界は 5 ng/g であった。

ま と め

各種食品に対応できるSD及びSTの分析法を検討した。試料をアセトン抽出後、ヘキサン転溶、脱脂、フロリジルカラムによる精製後、SIMモードのGC/MSで分析を行う方法を作成した。これまで分析対象とされていなかった化合物も含めて、10種の化合物の分析が行えるようになった。また抽出の際にエマルジョンを形成することがなく、25 ng/g 添加時の回収率はおおむね 70%以上、CV値も 5%以下と良好な結果が得られた。なお本法による各化合物の定量限界は 5 ng/g であった。

文 献

- 1) 河村葉子, 西暁子, 前原玉枝, 他: 食衛誌, **39**, 390-398, 1998.
- 2) 山田敏広, 田中政春, 平野哲, 他: 分析化学, **49**, 857-867, 2000.
- 3) 坂本広美, 松坂綾子, 伊藤理美子, 他: 食衛誌, **41**, 201-205, 2000.
- 4) 門上希和夫: "環境ホルモン", p67(1997), (環境新聞社)
- 5) 環境庁水質保全局水質管理課: "外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質, 底質, 水生生物)", pVI-1(1998)
- 6) 河村葉子, 河村麻衣子, 武田由比子, 他: 食衛誌, **39**, 199-205, 1998.
- 7) 金子令子, 渡辺悠二, 船山恵市, 他: 東京衛研年報, **50**, 208-214, 1999.
- 8) 中田有紀, 阪井麻里, 日向正文, 他: 分析化学, **49**, 775-780, 2000.
- 9) 河村葉子, 西暁子, 佐々木春美, 他: 食衛誌, **39**, 310-314, 1998.
- 10) 村橋毅: 自動車研究, **23**, 144-147, 2001.