

プラスチック製容器から溶出されたノニルフェノールの食品への移行について

安井明子*, 大石充男*, 石川ふさ子*, 新藤哲也*,
堀江正男*, 伊藤弘一*

Migration of Nonylphenol from Plastic Food Packaging into Foods

Akiko YASUI*, Mitsuo OISHI*, Fusako ISHIKAWA*, Tetsuya SHINDO*,
Masao HORIE* and Koichi ITO*

Keywords : ノニルフェノール Nonylphenol, 食品 Food, プラスチック Plastic, ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS, 溶出試験 migration test

はじめに

ノニルフェノール（以下NPと略す）は平成13年8月に環境省によって魚類に対する内分泌かく乱作用が確認された^{1) 2)}物質であり、ほ乳類に対しては、低濃度では明らかな内分泌かく乱作用は認められていないが、現時点ではリスクの評価が難しく、子どもや次世代への影響が懸念されている。

また、NPは、容器の製造の際に金型に使用される離型剤の界面活性剤（ノニルフェノールエトキシレート）や、ポリスチレンに配合する原料樹脂（ポリブタジエンまたはスチレン・ブタジエン共重合体）中の酸化防止剤（トリスノニルフェニルフォスファイト）の原料として幅広く使用されている。これらが分解してNPを遊離することが指摘されており、食品用プラスチック製剤中に検出されることがある³⁾。さらに、食品包装材から食品へとNPが移行することが指摘されている^{4) 5)}。

平成15～16年度に、東京都健康安全研究センター容器包装研究室で行われた食品擬似溶媒を用いた溶出試験において、食品の容器として使われたプラスチック製容器からNPが検出された。そこでNPがどの程度容器から食品へ移行するのかを調査するため、これらの検体について食品中のNPを、GC/MS及びLC/MS/MSを用いて分析したので報告する。

なお、NPはノニル基の分岐や結合位置の違いにより、理論上170の異性体が存在するが、前報⁶⁾同様、今回は環境中から主に検出され、内分泌かく乱作用が比較的強いとされている4-ノニルフェノールを分析対象とした。

実験方法

1. 試料

平成15年4月から平成16年12月にかけて都内で市販され

ていた食品のうち、東京都健康安全研究センター容器包装研究室において、食品擬似溶媒（*n*-ヘプタン）を用いた溶出試験で容器からNPが検出された食品10検体について分析を行った。その内訳は、平成15年度4検体（クッキー、ラクトアイス、氷菓、パフェ）及び平成16年度6検体（ラクトアイス3検体、パフェ2検体、アイスマルク）である。

2. 試薬

ノニルフェノール（NP）：東京化成工業（株）製の4-ノニルフェノールを使用した。標準原液：標準品10 mgを10 mLのメスフラスコにとり、アセトンを加えて10 mLとした（1,000 µg/mL）。標準溶液：標準原液を用時希釈し、分析に供した。メタノール、アセトン、アセトニトリル：和光純薬工業（株）製の残留農薬・PCB試験用5000を用いた。固相抽出カートリッジ：Isolute Multimode(500 mg/3 mL)、ユニフレックス社製、水：EDSポリッシュャー付きミリQ ST-TOC超純水製造装置（日本ミリポア社製）で精製したものを使用した。

3. 器具の前処理

試験溶液の調製時に用いたすべてのガラス器具及び金属器具は、NPの汚染を避けるために200℃で2時間以上加熱し、アセトンで3回洗浄してから実験に用いた。

4. 装置および測定条件

1) GC/MS ガスクロマトグラフ/質量分析計：GC-17A/QP-5000 島津製作所（株）製、カラム：DB-5MS（0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚0.25 µm）J&W社製、カラムオーブン温度：80℃(1min)→30℃/min→150℃→10℃/min→260℃→30℃/min→300℃(1 min)、気化室温度：250℃、インターフ

* 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所 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

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

エース温度280°C, キャリアガス:ヘリウム, イオン化電圧:70 eV, 検出器電圧:1.80 kV, 注入量:2 μ L (スプリットレス), 測定モード:SIM (m/z 107,121,135,149,220)

2) LC/MS/MS 高速液体クロマトグラフ: Waters 2690 Waters社製, 質量分析計: Quattro Ultima MICROMASS社製, 測定モード: ESI (-), モニターイオン: m/z 219 \rightarrow 133, イオンソース温度: 120°C, デイソルベーション温度: 350°C, キャピラリー電圧: 3.00 kV, コーン電圧: 35 V, コリジョンエネルギー電圧: 30 eV, カラム: CAPCELL PAK C18 UG120(2.0 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m)shiseido社製, 移動相: アセトニトリル-水 (6:4), 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 2 μ L, カラムオープン温度: 40°C

5. 試験溶液の調製

試料約5 gを50 mL遠沈管に正確に量り, メタノールで正確に30 mLとし, ホモジナイズ後, 遠心分離した. その上清6 mLに水を加えて20 mLとし, Isolute Multimodeカートリッジ (メタノール10 mL次いで水10 mLでコンディショニングしたもの)に全量負荷した. 50%メタノール3 mLで洗浄後, メタノール10 mLでNPを溶出し, 溶出液を約0.1 mLに減圧濃縮後, アセトンで正確に1 mLとし, GC/MSおよびLC/MS/MS試験溶液とした.

6. 定性および定量

NPの定性は, 前報⁶⁾と同様, GC/MSの4種のフラグメントイオン (m/z 107,121,135,149)の相対強度を試料と標準液で比較して行い, 分子イオンピークである m/z 220を定性確認に用いた. また, LC/MS/MS (m/z 219 \rightarrow 133)によるピークも定性確認として用いた.

定量は, GC/MSの4種のフラグメントイオンのトータルクロマトグラムのうち, 強度が高い約10本のピークの総面積を用いて絶対検量線法で行った.

結果及び考察

前報では, 佐々木らの方法⁷⁾に準じて分析を行ったが, 操作が煩雑であったので, 今回は前処理操作の簡便な堀江らの方法⁸⁾を若干改良した方法で分析試料を作製した.

NPは動物性食品中にグルクロン酸抱合体⁹⁾又は硫酸抱合体として含まれている可能性がある. 堀江らは, β -グルクロニダーゼを加えてグルクロン酸抱合体の測定も行っているが, 今回は, 容器から移行したNPを測定するため, 抱合体としては存在しないものと考え, グルクロン酸抱合体の分析は行わなかった.

1. 前処理法の検討

1) 固相抽出カラムからのNPの溶出 精製操作で用いる,

Bond-Elute SAX, NEXUS (Varian社製), OASIS MAX (Waters社製)など数種類の固相抽出カラムの検討をしたところ, ロットによってカラム自体からNPの溶出が生じることがあった. Isolute Multimodeカラムについては, フリット, シリンジ, 充填剤のいずれよりもNPの溶出はなかったが, 分析を始める前に固相抽出カラムからNPの溶出を調べることが重要であると思われた.

2) 試験溶液 堀江らは試験溶液に70%メタノールを用いているが, GC/MSで分析する際に他の溶媒に溶かした時よりもNPのイオン強度が低いので, GC/MS及びLC/MS/MSの両方共通で高感度に測定できる溶媒の検討を行った. メタノールやアセトニトリルでは, 残留物が全て溶解しない場合があり, また, 十分な感度が得られなかった. 一方, アセトンの場合には, 残さず全てが溶解し, 良好な感度が得られたことから, 試験溶液をアセトンとした.

2. LC/MS/MS条件の検討

1) LC条件 堀江ら⁸⁾はLC/MSによるNP分析において, 移動相に0.005%酢酸及び1 mmol/L酢酸アンモニウム含有50%アセトニトリルとアセトニトリルを用い, グラジエントで分析している. 今回は, より簡便にするため, アセトニトリル-水系移動相の割合を変化させて, アイソクラティックでの最適条件の検討を行ったところ, アセトニトリル:水=6:4の条件において, 妨害ピークのない良好な分離が得られたため, この条件で測定を行った.

2) MS条件 イオン化モードについては, フェノール性水酸基を有していることから, ネガティブモードを選択した. LCはGCに比べ, 分離能が低下するためにLC/MSで測定した場合, NPは一つのピークとして観察された. また, 基準ピークが[M-H]⁻ (m/z 219)の擬分子イオンとなり, 他のフラグメントイオンがほとんど観察されなかった. このため, 試料中にNPと質量数が近似した物質が存在すると定量を妨害されることが懸念される. そこで, 今回はLC/MS/MSを用い, LCにおけるNPの溶出時間, 親イオンの質量数, さらにプロダクトイオンの質量数と3つの同定手段を用いてNPの検出を試みた.

m/z 219をプリカーサーイオンとしてドータースキニングを行った結果, m/z 133に最も強度の高いプロダクトイオンが確認されたので, これを定性, 定量に用いた.

さらに, コーン電圧やデイソルベーション温度など, 各パラメータの最適測定条件を検討した結果, 上記に示した条件を設定した.

3. 添加回収試験

添加回収試験はGC/MSを用いて行った. NPが含まれていないことを確認したクッキー及びアイスクリームにNPを0.2 μ g/gになるように添加して添加回収試験を行った. そ

の結果を表1に示した。回収率はクッキーでは82.1~87.0%、アイスクリームでは83.1~96.1%となり、良好な回収率が得られた。本法による検出限界は、5 ng/gであった(S/N=3)。

表1. ノニルフェノールの添加回収率

試料	回収率(%)*
ラクトアイス	92.0±4.8
クッキー	83.4±1.8

*Mean±S.D.(n=5) ; spiked at 0.2 µg/g

4. 容器から食品へのNPの移行

当センター容器包装研究室で行った食品擬似溶媒を用いた溶出試験において、容器よりNPの溶出が認められた¹⁰⁾食品中のNP含有量は表2の通りであった。n-ヘプタンを用いた食品擬似溶媒溶出試験でNPを2800 ppm検出した耐衝撃性ポリスチレン容器に詰められたアイスクリームからはNPが140 ng/g検出された。このアイスクリームのLC/MS/MSクロマトグラムを図1に示した。それ以外の食品からはNPは検出されなかった。

アイスクリーム1検体以外からNPが検出されなかった原因として、プラスチック中に含まれるNP量が少ないこと、プラスチック部分と食品部分の接触が少なかったこと、NPが移行しやすい油脂分の含量が少ない食品であったことが考えられる。No.2の結果と比較した場合、No.3とNo.4についてはn-ヘプタンを用いた擬似食品溶媒溶出試験の結果からNPの食品への移行の可能性が考えられたが、実際の食品中のNP濃度は検出限界以下であった。この原因として、容

器のプラスチック部分と食品部分の接触面積が少なかったことや、製造工程におけるNPが移行しやすい液体状態での食品と容器との接触時間やその時の温度等の条件の違いなどによるものではないかと考えられた。

容器の製造業者においても、酸化防止剤としてトリスノニルフェニルフォスファイトが含まれない原料樹脂を使用することや、ノニルフェノールエトキシレート界面活性剤を使用しない離型剤への切り替えを行っている。こうした対策が関係各業界に浸透することにより、NPが食品に移行する食品容器はより少なくなるものと考えられる。

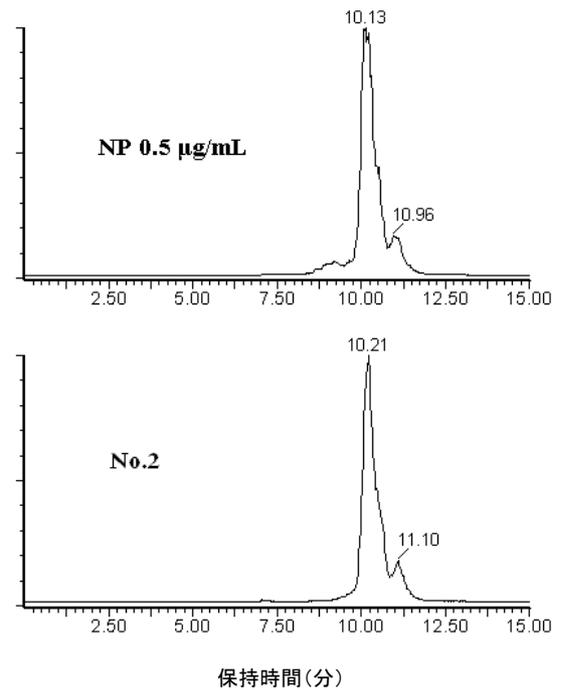


図1. NP標準溶液(0.5µg/mL)とNPを検出したラクトアイス(No.2)のLC/MS/MSクロマトグラム

表2. 溶出試験でプラスチック製容器からNPが検出された食品中のNP含有量

No.	食品の種類	容器材質	材質中含有量 (µg/g)	食品擬似溶媒 (n-ヘプタン) による溶出試験 (ng/cm ²)	食品中の含有量 (ng/g)
1	クッキー	PS	78	7.6	ND
2	ラクトアイス	PS(B)	940	2800	140
3	アイスマルク	PS(B)	660	700	ND
4	ラクトアイス	PS(B)	400	760	ND
5	ラクトアイス	PS(B)	28	57	ND
6	ラクトアイス	PS	6.4	7.5	ND
7	パフェ	PS(B)	2.4	11	ND
8	パフェ	PS	1.8	9.7	ND
9	パフェ	PS(B)	2	13	ND
10	氷菓	PS(B)	46	170	ND

PS: Pポリスチレン, PS(B): 耐衝撃性PS, ND < 5 ng/g

まとめ

食品擬似溶媒 (*n*-ヘプタン) を用いた溶出試験においてプラスチック容器からNPが2~2800 ng/cm²検出された検体について、その食品中のNP分析を、GC/MSおよび選択性の高いLC/MS/MSによる簡便な分析法により行った。その中で、溶出試験においてNPが最も高く検出された容器中のアイスクリーム1検体より140 ng/gのNPが検出された。容器から食品へのNPの移行は、プラスチック中のNP含有量や、プラスチック部分と食品部分の接触面積、NPが移行しやすい油脂分の食品中の量に影響すると考えられた。

文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課編：環境ホルモン戦略計画SPEED'98 取組の成果，2004.
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部編：ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告（案），2001.
- 3) 河村葉子，前原玉枝，飯嶋広代，他：食衛誌，**41**，212-218，2000.
- 4) 小川裕子，河村葉子，米谷民雄，他：日本食品衛生学会第83回学術講演会講演要旨集，36，2002.
- 5) 船山恵市，金子令子，羽石奈穂子，他：東京健安研七年年報，**54**，242-246，2003.
- 6) 安井明子，大石充男，石川ふさ子，他：東京研安研七年年報，**56**，221-226，2005.
- 7) 佐々木久美子，高附巧，根本了，他：食衛誌，**40**，460-472，1999.
- 8) 堀江正一，戸谷和男，竹上晴美，他：第39回全国衛生化学技術協議会，52-53，2002.
- 9) Thibaut, R., Debuauwer, L., Rao, D., et al. : *Xenobiotica*, **28**, 745-757, 1998.
- 10) 金子令子：東京都健安研七年年報，**57**，273-277，2006