

# 食品中のアルキルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールの分 析

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	佐々木, 久美子 高附, 巧 根本, 了 今中, 雅章 衛藤, 修一 村上, 恵美子 豊田, 正武
巻/号	40巻6号
掲載ページ	p. 460-472
発行年月	1999年12月

## 報 文

食品中のアルキルフェノール及び  
2,4-ジクロロフェノールの分析

(平成 11 年 7 月 19 日受理)

佐々木久美子\*<sup>1</sup> 高 附 巧\*<sup>1</sup> 根 本 了\*<sup>1</sup> 今中雅章\*<sup>2</sup>  
衛 藤 修 一\*<sup>3</sup> 村上恵美子\*<sup>3</sup> 豊田正武\*<sup>1</sup>

## Determination of Alkylphenols and 2,4-Dichlorophenol in Foods

Kumiko SASAKI\*<sup>1</sup>, Satoshi TAKATSUKI\*<sup>1</sup>, Satoru NEMOTO\*<sup>1</sup>, Masaaki IMANAKA\*<sup>2</sup>,  
Shuichi ETO\*<sup>3</sup>, Emiko MURAKAMI\*<sup>3</sup> and Masatake TOYODA\*<sup>1</sup>(\*<sup>1</sup>National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; \*<sup>2</sup>Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health: 739-1, Uchio, Okayama 701-0298, Japan; \*<sup>3</sup>Kitakyushu Municipal Institute of Environment Health Sciences: 1-2-1, Shinike, Tobata-ku, Kitakyushu 804-0082, Japan)

An analytical method using GC/MS was developed for the determination of 11 alkylphenols and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) residues in various foods. The phenolic compounds were extracted with 50% diethyl ether-hexane after the alkaline decomposition of food samples. The extracts were cleaned up on an acidic alumina column and a SAX cartridge. The phenolic compounds were derivatized with heptafluorobutyric anhydride and the derivatives or parent compounds were determined by GC/MS (SIM or SCAN). The method was applied to determine alkylphenols and 2,4-DCP residues in 190 food samples purchased from markets. 4-Nonylphenol was found in some fish, meat and vegetables at the levels of 10~723 ng/g, 9~180 ng/g and 7~131 ng/g, respectively. In addition, 2,4-DCP was detected in some vegetables (2~17 ng/g).

(Received July 19, 1999)

**Key words:** アルキルフェノール alkylphenol; 2,4-ジクロロフェノール 2,4-dichlorophenol; ノニルフェノール nonylphenol; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

## 緒 言

アルキルフェノールは内分泌かく乱性を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。中でもノニルフェノール (4-ノニルフェノール, 異性体混合物, 4-NP と略記) は卵巣摘出ラットでの子宮内膜増殖性など<sup>2)</sup>の内分泌かく乱性が報告されており, 4-*n*-オクチルフェノール及び 4-*tert*-オクチルフェノールは *in vitro* 試験でエストロゲン作用を有する<sup>3)</sup>ことが報告されている。4-NP は生産量が多く, 界

面活性剤 (ノニルフェノールポリエトキシレート) の合成原料であり, 農薬製剤などにも広く使用されていることから, 環境中に放出された界面活性剤が 4-NP に分解して, 水棲生物に影響を与えることが懸念されている<sup>4)</sup>。

また, ハロゲン化フェノールである 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP と略記) も内分泌かく乱性が疑われている。

これらのフェノール化合物が環境汚染, 生産過程, 包装材料などを通して食品を直接的, 間接的に汚染する可能性があるが, 広範な食品中のこれらの化学物質を一斉分析した例はほとんど報告されていない<sup>5), 6)</sup>。そこで, 同時分析が可能な 11 種のアルキルフェノールと 2,4-DCP

\*<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1\*<sup>2</sup> 岡山県環境保健センター: 〒701-0298 岡山市内尾 739-1\*<sup>3</sup> 北九州市環境科学研究所: 〒804-0082 北九州市戸畑区新池 1-2-1

Table 1. Monitoring Ions for GC/MS (SIM) Analysis of HFBA Derivatives of Alkylphenols and 2,4-DCP

No.	Analyte	Retention time (min)	Monitoring ions ( $m/z$ ) <sup>1)</sup>			
			1	2	3	4
1	2,4-Dichlorophenol	9.69	<u>357.9</u>	161.0	359.9	133.0
2	4- <i>n</i> -Butylphenol	— <sup>2)</sup>	—	—	—	—
3	4- <i>sec</i> -Butylphenol	10.46	<u>317.1</u>	346.0	318.1	103.1
4	4- <i>tert</i> -Butylphenol	10.22	<u>331.1</u>	303.0	169.0	346.0
5	4- <i>n</i> -Pentylphenol	12.35	<u>303.0</u>	360.1	275.0	304.0
6	4- <i>tert</i> -Pentylphenol	11.53	<u>331.1</u>	303.0	169.0	332.0
7	4- <i>n</i> -Hexylphenol	13.57	<u>303.0</u>	275.0	374.1	169.0
8	4- <i>n</i> -Heptylphenol	14.73	<u>303.0</u>	388.1	304.0	275.0
9	4- <i>n</i> -Octylphenol	15.83	<u>303.0</u>	402.2	304.0	275.0
10	4- <i>tert</i> -Octylphenol	13.88	<u>331.1</u>	332.0	303.0	169.0
11	4- <i>n</i> -Nonylphenol	16.89	<u>303.0</u>	416.1	304.0	275.0
12	4-Nonylphenol-1 <sup>3)</sup>	14.79	<u>317.1</u>	303.0	359.1	318.1
13	4-Nonylphenol-2	14.92	<u>331.1</u>	303.0	332.0	317.1
14	4-Nonylphenol-3	15.00	<u>317.1</u>	303.0	345.0	387.1
15	4-Nonylphenol-4	15.07	<u>331.1</u>	303.0	332.0	317.1
16	4-Nonylphenol-5	15.10	<u>317.1</u>	303.0	345.0	387.1
17	4-Nonylphenol-6	15.13	<u>331.1</u>	303.0	332.0	317.1
18	4-Nonylphenol-7	15.20	<u>331.1</u>	303.0	332.0	317.0
19	4-Nonylphenol-8	15.24	<u>345.0</u>	303.0	317.1	359.1
20	4-Nonylphenol-9	15.29	<u>317.1</u>	303.0	331.1	373.1
21	4-Nonylphenol-10	15.35	<u>317.1</u>	303.0	359.1	275.0
22	4-Nonylphenol-11	15.43	<u>331.1</u>	303.0	332.0	275.0
23	4-Nonylphenol-12	15.54	<u>345.0</u>	303.0	317.1	275.0

<sup>1)</sup> Under lined: target ion, others: qualifier ions

<sup>2)</sup> —: not tested

<sup>3)</sup> 4-Nonylphenols are numbered according to their order of retention time.

のGC/MSによる一斉分析法を確立し、各種の食品を分析して、食品中濃度を明らかにした。

### 実験方法

調査研究は3機関で実施した。試験溶液調製法とGC/MS測定条件は機関によって一部異なる。実験方法及び結果について、機関により異なる部分については、それぞれ機関No. 1, 2, 3と区別して記載した。

#### 1. 調査対象化学物質

アルキルフェノール11種(4-*n*-ブチルフェノール, 4-*sec*-ブチルフェノール, 4-*tert*-ブチルフェノール, 4-*n*-ペンチルフェノール, 4-*tert*-ペンチルフェノール, 4-*n*-ヘキシルフェノール, 4-*n*-ヘプチルフェノール, 4-*n*-オクタチルフェノール, 4-*tert*-オクタチルフェノール, 4-*n*-ニルフェノール, 4-NP)及び2,4-DCP。

#### 2. 調査対象食品

精白米8検体, 畜産物(豚肉, 牛肉, 鶏肉, レバー)41検体, 水産物(あじ, ふぐ, たちうお, さわら, あまだい, たい, ぶり, はまち, いわし, さば, まぐろ, えそ, さっば, ぼら, わかさぎ, こい, さけ, かき)39検体, 乳製品(バター, チーズ, 牛乳)26検体, 野

菜(ばれいしょ, ほうれんそう, ブロッコリー, もやし, 大葉)40検体, 果実(りんご, ぶどう, いちご)21検体, 缶詰(コーン, ツナ, コンビーフ)15検体, 合計190検体。いずれもスーパーマーケット及び小売店で市販品を購入した。ぶどう及び缶詰を除いてそれぞれの品目を2又は3機関で調査した。

#### 3. 試薬・試液

エタノール, メタノール, アセトニトリル, アセトン, ジエチルエーテル, トルエン, シクロヘキサン及び*n*-ヘキサン(ヘキサン), 無水硫酸ナトリウム: 片山化学(株), 和光純薬工業(株)又は関東化学(株)製の残留農薬試験用を使用した。

水: 住友精密工業(株)製のVOC測定用水を使用した(機関1)。食塩水は和光純薬工業(株)製残留農薬試験用塩化ナトリウムを蒸留水に10%となるように溶解後, ヘキサンで3回洗浄した(機関2)。蒸留水をXAD樹脂に通して使用した(機関3)。

水酸化カリウム: ナカライテスク(株)製の半導体用特性試薬を使用した。

硫酸: 片山化学(株)製の精密分析用

Sample (10.0 g, butter 2.0 g, cheese 5.0 g)

- ethanol 50 mL
- KOH 6.5 g
- boiling stone 2 g
- reflux for 1 hr
- cool to room temp.
- filter with glass filter, or centrifuge
- wash the residue with ethanol 50 mL

Filtrate

- water 250 mL, or 10% NaCl 250 mL
- adjust at pH5-6 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ca. 2.6-2.9 mL)
- extract with 50% diethyl ether/hexane 100 mL, 50 mL

Extract

- dehydrate with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 g
- evap. to ca. 4 mL
- adj. to 10 mL with diethyl ether

(non-fatty sample)  
5 mL aliquot

- evap. to ca. 1 mL
- adj. to 5 mL with hexane

(fatty sample)  
5 mL aliquot

- evap. to ca. 2 mL
- load on Extrelut NT3 column with diethyl ether 1 mL
- dry the column by vacuum
- connect the column to Sep-Pak C18 conditioned with acetonitrile 5 mL
- elute with acetonitrile 17 mL

Eluate (ca. 10 mL)

- evap. to near dryness
- adj. to 5 mL with hexane

Solution

- pass through alumina column (15mm i.d.) packed with acidic alumina deactivated with 10% water 5 g and anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g
- elute with 20% diethyl ether/hexane 100 mL

Eluate

- evap. to ca. 1 mL
- adj. to 2 mL with hexane

Solution

- pass through SAX (1 g/6 mL) conditioned with each 10 mL of methanol acetone, and hexane
- wash the column with 7% (or 3%) acetone/hexane 20 mL
- elute with 70% acetone/hexane 10 mL

Eluate

- evap. to ca. 50  $\mu$ L
- toluene 1 mL

Sample solution for GC/MS (without derivatization)

- derivatized with heptafluorobutylic anhydride (details are in Scheme 1-2)

Sample solution for GC/MS (with derivatization)

**Scheme 1-1.** Analytical procedure for alkylphenols and 2,4-DCP in foods

Sample solution (without derivatization, toluene) 1 mL

- 5% triethylamine/toluene solution 50  $\mu$ L
- shake
- heptafluorobutylic anhydride (HFBA) 100  $\mu$ L
- stand for 30 min in room temp. with occasional shake
- 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 6.0) 5 mL
- shake
- centrifuge (3,000 rpm, 5 min)

Upper layer

- pass through Sep-Pak Dry conditioned with hexane 5 mL
- add hexane 2 mL on the bottom layer
- load the hexane layer on the Sep-Pak Dry
- elute with hexane 2 mL

Eluate

- evap. to ca. 10  $\mu$ L
- dissolve in hexane 2 mL

Sample solution for GC/MS (with derivatization)

**Scheme 1-2.** Derivatization procedure of alkylphenols and 2,4-DCP by HFBA

トリエチルアミン：片山化学（株）製の特級品  
 ヘプタフルオロ酪酸無水物 (HFBA)：和光純薬工業（株）製のガスクロマトグラフ (ECD) 分析用を用いた。  
 $^{13}\text{C}_6\text{-HCB}$ ：CIL 製のものをトルエンに溶解して使用した。

アルミナ：ICN Biomedicals GmbH 製の酸性アルミナ（活性 I）。

10% 含水酸性アルミナ：アルミナを 130°C で 18 時間以上活性化し、デシケーター中で放冷した後、45 g に水を加え 50 g とした。

カートリッジカラム：Varian Mega Bond Elut®SAX (1 g/6 mL), Waters Sep-Pak® Plus C18, Merck KGaA Extrelut® NT3 及び Waters Sep-Pak®Dry を使用した。

沸騰石：和光純薬工業（株）製の水質分析用又はフナコシ製を使用した。

標準品：東京化成工業（株）、関東化学（株）又は Dr. Ehrenstorfen GmbH の試薬を用いた。なお、4-NP は東京化成工業（株）製を使用した。

標準原液：各標準品 10.0 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。

**4. 装置及び操作条件**

**機関 1**

ガスクロマトグラフ/質量分析計：HP5890 (Series II)-HP5972 MSD (Hewlett® Packard 社製)

カラム：DB-5MS (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m) (J & W Scientific 社製) にガードカラムとして不活性化キャピラリーカラム (内径 0.25 mm, 長さ 1 m) を接続

オープン温度：50°C (1 min)→10°C/min→300°C (4 min)

注入口温度：250°C

トランスファーライン温度：310°C

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min, 定流量モード)

注入時圧力プログラム：7.7 psi→99 psi/min→40 psi (0.1 min)→99 psi/min→7.7 psi

イオン化電圧：70 V

測定モード：SIM (モニターイオンは Table 1 に示した)

SCAN (スキャン範囲：50~650 amu, スキャンスピード：1.2 scans/sec)

注入量：2  $\mu$ L (スプリットレス)

**機関 2**

ガスクロマトグラフ/質量分析計：HP 5890-JEOL DX303

カラム：DB-5MS 及び DB-5.625 (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m)

オープン温度：100°C (2 min)→10°C/min→280°C (15 min)

注入口温度：230°C

キャリアーガス：ヘリウム

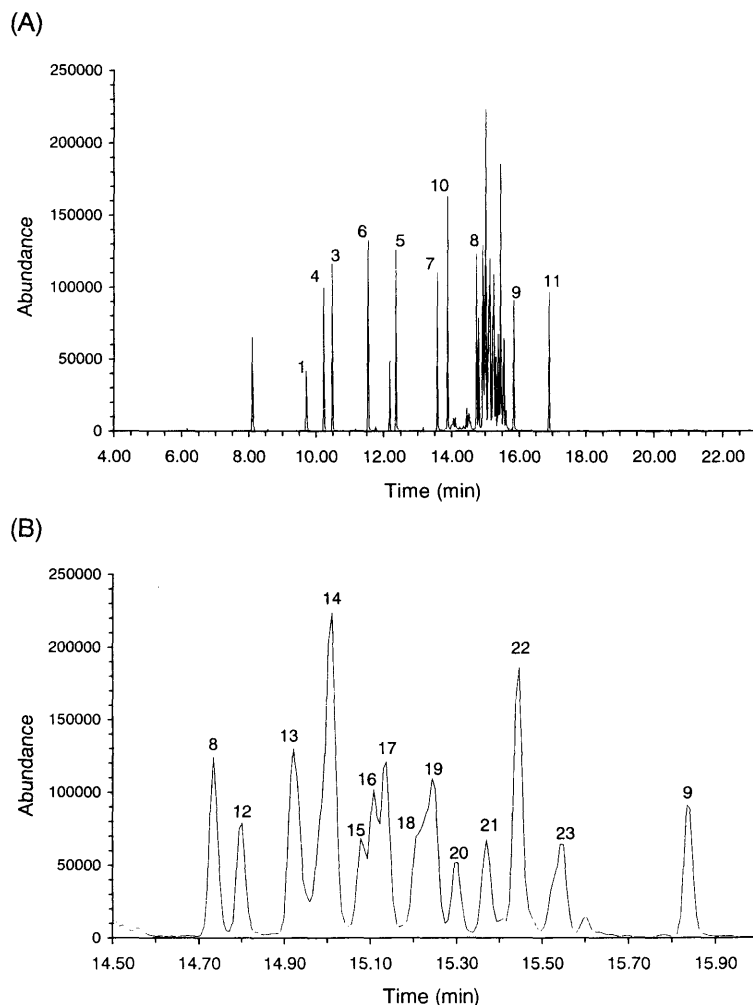
イオン化電圧：70 V

イオン源温度：250°C

インターフェース温度：295°C

測定モード：SIM, モニターイオン  $m/z=107, 121, 135, 162, 220, 290$

注入量：1  $\mu$ L (スプリットレス)



**Fig. 1.** Total ion chromatograms by GC/MS (SIM) of HFBA derivatives of alkylphenols and 2,4-DCP standards

(A) Retention time: 0~23 min, (B) Retention time: 14.5~16.0 min. Each derivative is equivalent to 0.25 ng of alkylphenols and 2,4-DCP except 4-NP (2.5 ng) or 2,4-DCP. Peak numbers correspond to No. in Table 1.

### 機関 3

ガスクロマトグラフ/質量分析計: HP5890 II-JEOL Automass 120 (System II)

カラム: SGE-BPX35 (内径 0.22 mm, 長さ 25 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m) (SGE 製)

オープン温度: 50°C (1 min)  $\rightarrow$  10°C/min  $\rightarrow$  210°C  $\rightarrow$  30°C/min  $\rightarrow$  300°C (5 min)

注入口温度: 280°C

キャリアーガス: ヘリウム

イオン化電圧: 70 V

イオン源温度: 210°C

インターフェース温度: 250°C

測定モード: SCAN (スキャン範囲 50~500 amu)

注入量: 1  $\mu$ L (スプリットレス)

### 5. 試験溶液調製法

機関 1: Scheme 1-1 に従った。HFBA 誘導体化は Scheme 1-2 に従った。

機関 2: Scheme 1-1 の方法に従った。但し、高脂肪性試料も Extrelut と C18 カラムによる脱脂操作は行わなかった。また、HFBA 誘導体化は行わず、最終検体量を 10 mL (トルエン) とし、内部標準として  $^{13}\text{C}_6$ -HCB を 50 ng 添加した。

機関 3: Scheme 1-1 の方法に従った。但し、高脂肪性試料も Extrelut と C18 カラムによる脱脂操作は行わ

Table 2-1. Recoveries of Alkylphenols and 2,4-DCP from Fortified Foods in Laboratory No. 1

No.	Analyte	Spike level (ng/g)	Recovery (%) <sup>1)</sup>			
			Beef	Butter	Rice	Spinach
1	2,4-Dichlorophenol	50	70±6	78±17	113±16	67±19
2	4- <i>n</i> -Butylphenol	— <sup>2)</sup>	—	—	—	—
3	4- <i>sec</i> -Butylphenol	50	75±5	111±9	101±13	87±5
4	4- <i>tert</i> -Butylphenol	50	75±6	96±13	97±12	90±5
5	4- <i>n</i> -Pentylphenol	50	70±6	108±9	107±14	93±4
6	4- <i>tert</i> -Pentylphenol	50	78±6	98±8	105±14	94±4
7	4- <i>n</i> -Hexylphenol	50	70±6	101±6	116±16	97±5
8	4- <i>n</i> -Heptylphenol	50	70±6	101±9	118±18	97±6
9	4- <i>n</i> -Octylphenol	50	66±7	97±6	111±18	94±6
10	4- <i>tert</i> -Octylphenol	50	78±6	109±9	112±15	94±5
11	4- <i>n</i> -Nonylphenol	50	63±6	93±8	114±17	94±6
12	4-Nonylphenol (Mix)	500	81±8	109±16	120±21	100±7

<sup>1)</sup> Mean ± S.D., *n* = 3

<sup>2)</sup> Not tested

なかった。HFBA 誘導体化は Scheme 1-2 に従ったが、反応はシクロヘキサン中で行った。

## 6. 定量、確認及び検出限界

機関1: 定量はGC/MS (SIM)で行った。Scheme 1-1 に示した低脂肪試料用及び高脂肪試料用試験溶液調製法の操作ブランクをそれぞれ6回及び3回分析し、それらの平均値を測定値から差し引き、その値がブランク値の標準偏差の3倍より大きいとき、検出とした。操作ブランクから分析対象化合物が検出されなかった場合は、S/N=3を与える標準品の濃度を検出限界とした。各化合物4本のフラグメントイオンをモニターし (Table 1), 定量にはそのうち1イオンを使用し、3イオンを定性に使用した。イオン強度比が3つ以上標準品のそれらと一致したものについて定量した。

機関2: 定量はGC/MS (SIM)で行った。<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-HCBを内部標準として感度補正を行った。4-NPの検出限界は操作ブランク値から、その他は標準品のS/Nから求めた。検出された2,4-DCP (大葉)と4-NP (魚介類)はマススペクトルで確認した。また、4-NP (りんご)はHFBA 誘導体化して保持時間を標準品のそれらと比較して同定した。

機関3: 定量はGC/MS (SCAN)で行った。操作ブランクから分析対象としたフェノール類は検出されなかったため、標準品のS/Nから検出限界を求めた。

## 結果及び考察

### 1. GC/MS 測定法の検討

フェノール化合物は誘導体化せずにGC/MSで測定することもできるが、試験溶液マトリックスの影響を受けやすい。誘導体化せずに測定した機関2では試験溶液を希釈してマトリックスの影響を低減し、内部標準を使用して感度補正を行った。機関1及び3はHFBA 誘

導体化して測定した。HFBA 誘導体化した標準品のSIM トータルイオンクロマトグラムを Fig. 1 に示した。各化合物のHFBA 誘導体は、SIM モードではSCAN モードに比べて約10倍高感度に測定できた (機関1)。

4-NPは異性体混合物であり、多数のピークが検出されたので、定量は主な12本のピークの総面積を用いて行った (機関1, 3)。誘導体化せずに測定した機関2ではSIM (*m/z* 135) 測定で検出された5本のピーク中、妨害を受けず、感度が高かった2本のピーク面積を用いて定量した。

### 2. 試験溶液調製法の検討

フェノール化合物は動物性食品中にグルクロン酸抱合体<sup>7)</sup>又は硫酸抱合体として含まれている可能性がある。また、タンパクや繊維成分への結合<sup>8)</sup>も報告されている。抱合体を含めて分析するためには酸分解が有効であるが、フェノール化合物を酸性下で加熱すると揮散しやすい。アルカリ分解では本来試料中に存在しなかったフェノール類が生成する可能性もあるが、抽出率を高めるためにアルカリ分解を選択した。アルカリ分解液を中和し弱酸性にしたものからの抽出溶媒として、ヘキサンは2,4-DCP、ブチルフェノール類及びペンチルフェノール類の回収率が低かったため、50% ジエチルエーテル-ヘキサンを使用した。

機関1では、高脂肪性試料の脱脂を目的に Extrelut 及びC<sub>18</sub>カラムによるクリーンアップ操作を加えたが、他の機関ではこの操作を省略した。脱脂を省略した抽出液はアルミナカラムからの溶出速度が遅く、脂肪成分がカラムから溶出したが、これはGC/MS 測定の妨害にはならなかった。また、機関3における牛肉及び魚の添加回収試験結果が良好であったことから、脂肪成分は

**Table 2-2.** Recoveries of Alkylphenols and 2,4-DCP from Fortified Foods in Laboratory No. 2

No.	Analyte	Spike level (ng/g)	Recovery (%) <sup>1)</sup>			
			Rice	Apple	Oyster	Milk
1	2,4-Dichlorophenol	50	71±4	80	78±2	77±2
2	4- <i>n</i> -Butylphenol	50	95±11	103	98±20	94±8
3	4- <i>sec</i> -Butylphenol	50	79±3	94	96±12	78±3
4	4- <i>tert</i> -Butylphenol	50	76±3	97	81±18	78±3
5	4- <i>n</i> -Pentylphenol	50	78±3	109	89±8	92±3
6	4- <i>tert</i> -Pentylphenol	— <sup>2)</sup>	—	—	—	—
7	4- <i>n</i> -Hexylphenol	50	88±7	110	104±10	109±7
8	4- <i>n</i> -Heptylphenol	50	89±5	115	93±12	108±3
9	4- <i>n</i> -Octylphenol	50	95±6	108	91±14	108±7
10	4- <i>tert</i> -Octylphenol	50	89±7	116	85±17	101±6
11	4- <i>n</i> -Nonylphenol	50	106±7	123	96±19	111±3
12	4-Nonylphenol (Mix)	500	—	—	—	—

<sup>1)</sup> Mean±S.D., *n*=3 except apple (*n*=2)

<sup>2)</sup> Not tested

**Table 2-3.** Recoveries of Alkylphenols and 2,4-DCP from Fortified Foods in Laboratory No. 3

No.	Analyte	Spike level (ng/g)	Recovery (%) <sup>1)</sup>		Spike level (ng/g)	Recovery (%) Apple
			Beef	Horse mackerel		
1	2,4-Dichlorophenol	10	81±10	64±13	100	3±1
2	4- <i>n</i> -Butylphenol	— <sup>2)</sup>	—	—	—	—
3	4- <i>sec</i> -Butylphenol	10	115±9	136±8	100	43±4
4	4- <i>tert</i> -Butylphenol	10	88±2	88±8	100	31±2
5	4- <i>n</i> -Pentylphenol	10	83±6	91±6	100	87±3
6	4- <i>tert</i> -Pentylphenol	10	94±9	96±10	100	68±3
7	4- <i>n</i> -Hexylphenol	10	106±15	104±7	100	108±5
8	4- <i>n</i> -Heptylphenol	10	70±8	68±8	100	105±5
9	4- <i>n</i> -Octylphenol	10	94±8	86±13	100	136±4
10	4- <i>tert</i> -Octylphenol	10	96±4	104±14	100	124±9
11	4- <i>n</i> -Nonylphenol	10	84±12	73±4	100	132±8
12	4-Nonylphenol (Mix)	100	126±11	96±2	1,000	129±9

<sup>1)</sup> Mean±S.D., *n*=3

<sup>2)</sup> Not tested

HFBA による誘導体化にも影響を与えなかったものと考えられる。

クリーンアップに使用するカラムとして、フロリジル、NH2 (Varian 製)、PSA (同)、SAX (同)、中性アルミナ (Waters 製)、酸性アルミナなどを検討し、対象化合物の回収率とクリーンアップ効果から、10%含水酸性アルミナと SAX を選択した。

誘導体化法として 2,4-dinitrofluorobenzene, trifluoroacetic anhydride 及び HFBA による方法を検討した結果、反応性が良好で、誘導体の分子量が大きくて GC/MS 測定時に試料中夾雑物の影響を受けにくい HFBA 誘導体化を選択した。HFBA 誘導体化の方法は Ehrsson らの方法<sup>9)</sup> に準じたが、反応溶媒はベンゼンを

トルエン又はシクロヘキサンに変更した。

### 3. 操作ブランクについて

2,4-DCP, 4-*tert*-ブチルフェノール, 4-*tert*-オクチルフェノール及び 4-NP が操作ブランクから検出された (機関 1)。Scheme 1-1 に示した低脂肪試料及び高脂肪試料の方法に従って各 6 回及び 3 回分析したときの操作ブランク値は両方法間で大きな差はなかった。全体の平均値は、検体 (10 g) 中濃度に換算して 0.6±0.3 ng/g (2,4-DCP), 0.12±0.05 ng/g (4-*tert*-ブチルフェノール), 0.17±0.02 ng/g (4-*tert*-オクチルフェノール), 7.7±2.5 ng/g (4-NP) であった。

### 4. 添加回収試験

確立した試験法に従って添加回収試験を実施した結果



Table 3. Analytical Results of 2,4-DCP in Foods

Foods	Lab. No.	No. of samples P/A <sup>1)</sup>	LOD (ng/g)	Found values (ng/g)		
Vegetable and Fruit						
Rice	1	0/5	1			
	2	0/3	1			
Potato	1	1/3	1	3		
	2	0/3	1			
Spinach	1	0/3	1			
	2	0/2	1			
Broccoli	1	0/3	1			
	2	0/2	1			
Bean sprouts (moyashi)	1	2/3	1	2	11	
	2	0/3	1			
Beefstake plant (ohba)	1	2/3	1	5	9	
	2	1/1	1	17		
Apple	1	0/3	1			
	2	0/3	1			
Grape	2	0/3	1			
Strawberry	1	0/3	1			
	2	3/3	1	11	12	13
Meat						
Beef	1	0/5	1			
	3	0/5	5			
Pork	1	0/5	1			
	3	0/5	5			
Chicken	1	0/6	1			
	3	0/5	5			
Liver	1	0/5	1			
	3	0/5	5			
Sea food						
Fish	2	0/14	1			
	3	0/15	5			
Oyster	2	0/5	1			
	3	0/5	5			
Dairy products						
Butter	1	0/5	5			
	2	0/3	5			
Cheese	1	0/5	3			
	2	0/5	5			
Milk	1	1/5	1	2		
	2	0/3	1			
Canned food						
Tuna	2	0/4	1			
Corned beef	3	0/5	5			
Sweet corn	1	0/6	1			

<sup>1)</sup> P/A: No. of positive sample/No. of analysed sample

を Table 2 に示した。精白米、牛肉、魚、かき、バター、牛乳、りんご及びほうれんそうに、4-NP を 500 ~ 1,000 ng/g、その他のフェノールを 10 ~ 100 ng/g 添加して分析したときの回収率はりんごを除いて 63 ~

136% であった。機関 3 のりんごは、2,4-DCP 及びブチルフェノール類の回収率が低かった。これらは濃縮操作中に揮散しやすいためと考えられる。

Table 4-1. Analytical Results of Alkylphenols in Foods

Foods	Lab. No.	No. of samples P/A <sup>1)</sup>	4-Nonylphenol								
			LOD (ng/g)		Found values (ng/g)						
Vegetable and Fruit											
Rice	1	4/5	8	10	17	17	114				
	2	0/3	50								
Potato	1	0/3	8								
	2	0/3	5								
	3	0/3	10								
Spinach	1	3/3	8	8	11	52					
	2	0/2	5								
	3	0/3	10								
Broccoli	1	1/3	8	39							
	2	1/2	5	29							
	3	0/3	10								
Bean sprouts (moyashi)	1	3/3	8	28	59	82					
	2	0/3	5								
	3	0/2	10								
Beefstake plant (ohba)	1	2/3	8	9	12						
	2	0/1	5								
	3	0/3	10								
Apple	1	3/3	8	9	18	21					
	2	2/3	5	13	131						
	3	0/3	10								
Grape	2	0/3	5								
Strawberry	1	1/3	8	11							
	2	1/3	5	7							
	3	0/3	10								
Meat											
Beef	1	4/5	8	11	19	37	43				
	3	1/5	5	Tr <sup>2)</sup>							
Pork	1	0/5	8								
	3	3/5	5	20	110	180					
Chicken	1	5/6	8	9	12	88	103	163			
	3	3/5	5	60	70	150					
Liver	1	3/5	8	45	52	57					
	3	1/5	5	70							
Sea food											
Fish	2	8/14	5	13	15	18	19	251	505	591	723
	3	6/15	5	10	60	180	250	380	450		
Oyster	2	3/5	5	16	51	69					
	3	0/5	5								
Dairy products											
Butter	1	4/5	38	52	57	68	89				
	2	0/3	50								
Cheese	1	5/5	15	15	29	31	38	86			
	2	1/5	5	21							
Milk	1	3/5	8	8	9	18					
	2	0/3	5								
Canned food											
Tuna	2	3/4	5	22	32	37					
Corned beef	3	0/5	5								
Sweet corn	1	2/6	8	89	123						

<sup>1)</sup> P/A: No. of positive sample/No. of analysed sample<sup>2)</sup> Tr: 1~5 ng/g

Table 4-2. Analytical Results of Alkylphenols in Foods

Foods	Lab. No.	No. of samples P/A <sup>1)</sup>	4- <i>tert</i> -Octylphenol					
			LOD (ng/g)	Found values (ng/g)				
Vegetable and Fruit								
Rice	1	5/5	0.1	0.3	0.4	0.5	0.5	0.8
	2	0/3	0.5					
Potato	1	2/3	0.1	0.1	0.1			
	2	0/3	0.5					
Spinach	3	0/3	5					
	1	3/3	0.1	0.7	0.8	1.3		
	2	0/2	0.5					
Broccoli	3	0/3	5					
	1	2/3	0.1	0.1	0.2			
	2	0/2	0.5					
Bean sprouts (moyashi)	3	0/3	5					
	1	3/3	0.1	1.2	1.2	1.5		
	2	0/3	0.5					
Beefstake plant (ohba)	3	0/2	5					
	1	3/3	0.1	0.5	0.7	0.8		
	2	0/1	0.5					
Apple	3	0/3	5					
	1	3/3	0.1	0.5	0.6	1.3		
	2	0/3	0.5					
Grape	3	0/3	5					
	2	0/3	0.5					
	1	3/3	0.1	0.3	0.5	0.5		
Strawberry	2	0/3	0.5					
	3	0/3	5					
Meat								
Beef	1	4/5	0.1	0.1	0.1	0.1	1.4	
	3	0/5	1					
Pork	1	1/5	0.1	0.1				
	3	1/5	1	10				
Chicken	1	3/6	0.1	0.4	23	47		
	3	1/5	1	20				
Liver	1	2/5	0.1	0.1	0.6			
	3	0/5	1					
Sea food								
Fish	2	0/14	0.5					
	3	0/15	1					
Oyster	2	0/5	0.5					
	3	0/5	1					
Dairy products								
Butter	1	5/5	0.3	0.7	1.0	1.0	1.7	2.8
	2	0/3	0.5					
Cheese	1	5/5	0.1	0.2	0.3	0.5	0.5	0.6
	2	0/5	0.5					
Milk	1	5/5	0.1	0.3	0.4	0.4	0.5	0.9
	2	1/3	0.5	4.3				
Canned food								
Tuna	2	0/4	0.5					
Corned beef	3	0/5	1					
Sweet corn	1	4/6	0.1	0.1	0.1	0.4	0.6	

<sup>1)</sup> P/A: No. of positive sample/No. of analysed sample

Table 4-3. Analytical Results of Alkylphenols in Foods

Foods	Lab. No.	No. of samples P/A <sup>1)</sup>	4- <i>tert</i> -Butylphenol				
			LOD (ng/g)	Found values (ng/g)			
Vegetable and Fruit							
Rice	1	4/5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5
	2	0/3	0.5				
Potato	1	0/3	0.2				
	2	0/3	0.5				
Spinach	1	2/3	0.2	0.3	2.1		
	2	0/2	0.5				
Broccoli	1	0/3	0.2				
	2	0/2	1				
Bean sprouts (moyashi)	1	0/3	0.2				
	2	0/3	0.5				
Beefstake plant (ohba)	1	3/3	0.2	0.7	0.8	1.6	
	2	0/1	0.5				
Apple	1	2/3	0.2	0.4	0.4		
	2	0/3	0.5				
Grape	2	0/3	0.5				
Strawberry	1	0/3	0.2				
	2	0/3	0.5				
Meat							
Beef	1	2/5	0.2	0.2	0.3		
	3	0/5	5				
Pork	1	0/5	0.2				
	3	0/5	5				
Chicken	1	3/6	0.2	0.3	0.9	1.2	
	3	0/5	5				
Liver	1	0/5	0.2				
	3	0/5	5				
Sea food							
Fish	2	0/14	0.5				
	3	0/15	5				
Oyster	2	0/5	0.5				
	3	0/5	5				
Dairy products							
Butter	1	2/5	0.7	1.3	3.9		
	2	0/3	0.5				
Cheese	1	2/5	0.3	0.5	0.7		
	2	0/5	0.5				
Milk	1	0/5	0.2				
	2	0/3	0.5				
Canned food							
Tuna	2	0/4	0.5				
Corned beef	3	0/5	5				
Sweet corn	1	3/6	0.2	0.5	0.6	0.7	

<sup>1)</sup> P/A: No. of positive sample / No. of analysed sample

### 5. 実態調査結果

市販食品 190 検体の汚染実態調査を実施した。これらはスーパーマーケット及び小売店で購入した市販品で

あり、乳製品、缶詰以外の生鮮食品の包装形態はトレイとラップで包装されたもの、ポリ袋入り、籠盛りなどであった。2,4-DCP, 4-NP, 4-*tert*-オクチルフェノール及び

4-*tert*-ブチルフェノールの分析結果を Table 3, 4-1, 4-2, 4-3 に示した。Table には検出検体数/調査検体数、検出限界及び検出値を示した。検出頻度が低かった他のアルキルフェノールについては本文中に結果を示した。

#### (1) 2,4-DCP について

2,4-DCP はいちご、大葉及びもやしからそれぞれ 11~13 ng/g, 5~17 ng/g 及び 2, 11 ng/g 検出された (Table 3)。2,4-DCP は農薬の代謝物として残留していたか、あるいは分析 (アルカリ分解) 中に 2,4-DCP 構造を有するプロチオホス, 2,4-D などの農薬から生成した可能性がある。

#### (2) 4-NP について

最も検出率が高かったのは 4-NP であり、肉類から 9~180 ng/g, 魚介類から 10~723 ng/g, 米から 10~114 ng/g, 野菜から 8~82 ng/g, 果実から 7~131 ng/g, 乳製品から 8~89 ng/g, 缶詰から 22~123 ng/g 検出された (Table 4-1)。

4-NP は特に魚介類 39 検体中 17 検体から検出され、濃度も高かった。魚種別ではさけで濃度が高い (251~723 ng/g) 傾向が認められた。その他の魚種でも、たちうお、たいなどで 180~450 ng/g 検出された。

畜肉では鶏肉での検出率が高かった (11 検体中 8 検体)。乳製品からの検出率は牛乳, バター, チーズで大差がないが、濃度は牛乳で低く、バター, チーズで高かった。

1998 年に環境庁が全国 130 地点で行った水質調査ではノニルフェノール及び 4-*tert*-オクチルフェノールの検出率はそれぞれ 76%, 62% と報告されている<sup>\*4</sup>。また、4-NP の生物濃縮係数は 40~100<sup>10)</sup>, 13~410<sup>11)</sup>, 1,300~3,400 (魚体を酵素処理して測定した場合)<sup>12)</sup> と報告されていることから、魚介類の 4-NP 汚染原因の 1 つは生息水域の汚染と考えられる。もう 1 つの原因として食品包装材による汚染が考えられる。調査した魚介類はスーパーマーケットなどでトレイ及びラップで包装して販売されていたものが多い。使用されていたトレイ及びラップ (各 3 検体, 材質は不明) を *n*-ヘプタンで抽出 (25°C, 1 時間浸漬) して Scheme 1-2 の方法で誘導体化して測定したところ、トレイから 3, 42, 1,293 ng/cm<sup>2</sup>, ラップから 249, 292, 629 ng/cm<sup>2</sup> の 4-NP が検出された (機関 1)。この結果は、食品包装材から魚介類へ 4-NP が移行した可能性を示唆するものである。

野菜, 果実からの検出例では、農薬の展着剤として使用されることがあるポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル<sup>13)</sup> 又は殺菌剤のノニルフェノールスルホン酸銅に由来する 4-NP が試料中に残留していたか分析 (アルカリ分解) 中にこれらから生成したことも考えられる。

4-NP については、試料中での存在形態、汚染源の解明、より多数の食品での汚染調査及びポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルの分解物であるノニルフェノールエトキシレート類の調査など今後も研究を継続する必要があると考えられる。

#### (3) その他のアルキルフェノールについて

検出限界が低い機関 1 では、4-*tert*-オクチルフェノールと 4-*tert*-ブチルフェノールが広範囲の検体から検出された (Table 4-2, 4-3)。4-*tert*-オクチルフェノールは特に鶏肉で 23 及び 47 ng/g 検出された。機関 3 又は 2 においても鶏肉, 豚肉及び牛乳でそれぞれ 1 検体から 20, 10 及び 4.3 ng/g 検出された。4-*tert*-ブチルフェノールは 23 検体から検出され、最高濃度は 3.9 ng/g (バター) であった。

その他のアルキルフェノールが散発的に検出された。

4-*sec*-ブチルフェノールはコーン缶詰 1 検体から 1.8 ng/g 検出された。4-*n*-ペンチルフェノールは牛肉 4 検体 (0.1~0.4 ng/g), バター (7.4 ng/g) 及び牛乳 (0.5 ng/g) から検出された。4-*tert*-ペンチルフェノールは大葉 3 検体 (0.5~1.6 ng/g) と肉類 5 検体 (0.2~0.8 ng/g) から検出された。4-*n*-ヘキシルフェノールは、いちご及びバター各 1 検体から 110 及び 2.3 ng/g 検出された。4-*h*-ブチルフェノールは、牛肉 2 検体から 0.6, 0.5 ng/g, 魚から 10 ng/g 検出された。4-*n*-ノニルフェノールはバター 2 検体から 1.2, 2.0 ng/g 検出された。

4-*n*-オクチルフェノールは全検体とも検出限界 (0.04~5 ng/g) 以下であった。機関 2 でのみ調査した 4-*n*-ブチルフェノールも全検体で検出限界 (0.5~1 ng/g) 以下であった。

#### 結 論

1) 内分泌かく乱性の疑いが指摘されている 11 種のアルキルフェノール及び 2,4-DCP を食品からアルカリ分解・抽出し、GC/MS で同時測定する系を確立した。

2) 上記 12 化合物を対象として、肉類, 魚介類, 乳製品, 精白米, 野菜, 果実及び缶詰, 合計 190 検体について汚染実態調査を行った。

3) その結果、魚介類, 肉類及び野菜・果実からそれぞれ 10~723 ng/g, 9~180 ng/g 及び 7~131 ng/g の 4-NP が検出された。4-NP は包装材からも検出された。また、一部の野菜から 2,4-DCP が 2~17 ng/g 検出された。その他に 4-*tert*-ブチルフェノール, 4-*tert*-オクチルフェノール, 4-*n*-ペンチルフェノール及び 4-*tert*-ペンチルフェノールなどが検出された。

#### 謝 辞

本研究は平成 10 年度厚生科学研究費補助金 (内分泌かく乱物質の健康影響に関する調査研究事業) 「内分泌かく乱物質の食品, 食器などからの暴露に関する調査研究」(主任研究者 斎藤生行) によって行った。関係各位に感謝いたします。

\*4 環境庁ホームページ (<http://www.eic.or.jp/eanet/>): 「水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) の実態概況調査 (夏季) 結果 (速報)」について

## 文 献

- 1) Inoue, T., Prospect of endocrine disrupting chemicals and their scientific basis. Food Sanitation Research, **48**(1), 47-61 (1998).
- 2) Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., Sonnenschein, C., *p*-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. Environ. Health Perspect., **92**, 167-173 (1991).
- 3) White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G., Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, **135**, 175-182 (1994).
- 4) Shang, D. Y., Macdonald, R. W., Ikonou, M. G., Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. Environ. Sci. Technol., **33**, 1,366-1,372 (1999).
- 5) Lye, C. M., Frid, C. L. J., Gill, M. E., Cooper, D. W., Jones, D. M., Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U. K. Tyne and Tees estuaries. Environ. Sci. Technol., **33**, 1,009-1,014 (1999).
- 6) Veningerova, M., Prachar, V., Uhnak, J., Kovacicova, J., Polychlorinated phenols in total diet. Z. Lebensm. Unters. Forsch., **199**, 317-321 (1994).
- 7) Thibaut, R., Debrauwer, L., Rao, D., Cravedi, J.-P., Characterization of biliary metabolites of 4-*n*-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica, **28**, 745-757 (1998).
- 8) Bokern, M., Harms, H., Toxicity and metabolism of 4-*n*-nonylphenol in cell suspension cultures of different plant species. Environmental Science & Technology, **31**, 1,849-1,854 (1997).
- 9) Ehrsson, H., Walle, T., Brotell, H., Quantitative gas-chromatographic determination of picogram quantities of phenols. Acta Pharm. Suecica., **8**, 319-328 (1971).
- 10) Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. Environ. Pollut., **79**, 243-248 (1992).
- 11) Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M., Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals. Environ. Pollut., **64**, 107-120 (1990).
- 12) Lewis, S. K., Lech, J. J., Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica, **26**, 813-819 (1996).
- 13) Sundaram, K. M. S., Liquid chromatographic method for the determination of nonyl phenol surfactant present in the commercial and spray formulations of aminocarb insecticide. J. Liquid Chromatogr., **18**, 1,787-1,799 (1995).