

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および動態解析

主任研究者 星薬科大学 薬品分析化学教室教授 中澤 裕之

HPLC を用いた缶詰食品中のビスフェノール A およびビスフェノール A 関連物質の分析

分担研究者 愛知県衛生研究所 宮崎 豊

協力研究者 埼玉県衛生研究所 小林 進

缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行したビスフェノール A の分析法について検討し、缶詰 72 検体について分析を行った。その結果、72 検体中 47 検体からビスフェノール A が約 1–22 μg /缶検出され、缶詰食品は、ビスフェノール A のヒトへの主要な暴露源として考えられた。また、検出された缶詰のほとんどは、加熱処理条件の厳しい野菜缶および肉・魚介缶であり、10 μg /缶以上検出された缶詰（9 検体）はすべてプルトップ型の缶詰であった。

さらに、20 検体について、BADGE および 2 種類の塩化水素付加体（HCl 型、2HCl 型）について分析したところ、BADGE が 3 検体（0.6–4 μg /缶）、BADGE・2HCl 型が 9 検体（0.1–47 μg /缶）、BADGE・HCl 型が 3 検体（0.1–2 μg /缶）から検出された。

【A.研究目的】

ビスフェノール A（以下 BPA）は、内分泌かく乱物質として疑われている化学物質である。BPA は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂等のプラスチックの原料として広く使用されているため、ヒトへの暴露およびヒトに対する影響について懸念されている。缶詰において、エポキシ樹脂は、缶壁から金属等の溶出を防ぐための内面コーティング剤として使用されており、BPA が缶詰食品中に移行している可能性がある。

飲料缶中の BPA については報告がなされているが、食品缶詰中のデータは少ない。

そこで、BPA のヒトに対する暴露量を把握するために、高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器–蛍光検出器を用いた缶詰食品中の分析法について検討し、缶詰食品中の BPA の分析を行った。

また、エポキシ樹脂のモノマーであるビスフェノール A ジグリシジルエーテル（以下 BADGE）は、現在のところ内分泌攪乱作用について報告は無いものの、BPA 骨格を有していることから今回注目し、脂溶性の高い塩化水素付加体（以下 BADGE・HCl、BADGE・2HCl）との同時分析を行った。

【B.研究方法】

B-1. BPAの分析法

B-1-1. 試料

市販の缶詰 72 種類について分析を行った（果実缶 17 検体，野菜缶 34 検体，肉・魚介缶 21 検体）。

B-1-2. 試薬

BPA 標準品（環境分析用，関東化学（株）製）
その他試薬は，残留農薬用，または HPLC 用を使用した。

OASIS HLB カートリッジ（60mg，Waters 社製）は，予めメタノール 20mL および精製水 10mL で前洗浄を行った。

フロリジルカートリッジ（Sep-pak plus，Waters 社製）は，予め 20%アセトン-ヘプタン 20mL および 5%アセトン-ヘプタン 10mL で前洗浄を行った。

B-1-3. 試験溶液の調製

缶詰食品は，固形分，液汁，油に分離し，それぞれについて試験溶液を調製した。分離の悪いものについては，内容物をホモジナイザーで均一化した後，固形分の試験溶液調製法で行った。

B-1-3-1. 固形試料

固形試料 5g（湿重量）をアセトニトリル 50mL と無水硫酸ナトリウム 15g でホモジナイズ抽出後，残さをアセトニトリル 30mL で洗浄を行い，先のアセトニトリル液と合わせた。ろ過後，ヘキサン 50mL と 10 分間振とうし，ヘキサン層を除去した。アセトニトリル層を減圧下 40℃で乾固した後，2.5%アセトン-ヘプタン 10mL に溶解し，フロリジルカラムでクリーンアップを行った。5%アセトン-ヘプタン 10mL で洗浄後，20%アセトン-ヘキサン 10mL で溶出し，溶出液を減圧乾固した。移動相 1mL

で溶解し，HPLC に注入した。

B-1-3-2. 液汁試料（スープ類を含む）

液汁 10mL に適宜精製水 10mL（< 0.02ppb，BPA）を加え混和し，OASIS HLB カートリッジに負荷した。40%メタノール 10mL で洗浄後，メタノール 5mL で溶出した。溶出液は減圧乾固後，移動相で溶解し，HPLC に注入した。妨害ピークがあった場合，さらにフロリジルカラムでクリーンアップを行った。

B-1-3-3. 油試料

静置分離した油 2.5g は，ヘキサン 50mL で希釈し，アセトニトリル分配を 2 回行った。アセトニトリル層を乾固した後，フロリジルカラムでクリーンアップを行い，最終液量は移動相で 0.5mL とした。

B-1-4. HPLC 測定条件

カラム：Wakosil II 3C18-RS
(4.6×150mm)

移動相：アセトニトリル/水=50/50

流速：0.8mL/min

カラム温度：40℃

注入量：20μL

検出器：フォトダイオードアレイ検出器
(228nm, 278nm)，蛍光検出器 (Ex/Em
=275nm/300nm)

B-2. BADGE および BADGE・HCl， BADGE・2HCl の分析

B-2-1. 試料

主として肉・魚介缶詰 20 検体について分析を行った。

B-2-2. 試薬

BADGE（東京化成（株）製）

BADGE・2HCl：Bisphenol A bis
(3-chloro-2-hydroxy-propyl) ether
(Fluka 社製)

BADGE・HCl: BADGE のメタノール溶液に 1%塩化ナトリウム溶液を加え、室温放置し、5 日目に固相抽出カートリッジ、OASIS HLB を用いて、脱塩、濃縮を行って調製した。

その他試薬は、残留農薬および HPLC 用のものを使用した。

B-2-3. 試験溶液の調製

BPA の試料調製法と同様な操作で行った。ただし、HPLC 注入液は、メタノール溶液に変更した。

B-2-4. HPLC 測定条件

カラム: Discovery RP-Amide C16
(4.6×150mm)

移動相: アセトニトリル/水=40/60

流速: 1.0mL/min

カラム温度: 40℃

注入量: 20 μL

検出器: 蛍光検出器

(Ex/Em=275nm/300nm)

【C. 結果および考察】

C-1. ビスフェノール A の分析

缶詰食品 72 検体について、BPA の分析を行った。検出限界は、固形分および油相で 10ppb、液汁で 5ppb であった。UV228nm および蛍光検出器を用いて定量を行い、フォトダイオードアレイ検出器で BPA ピークの UV スペクトルを確認した。Fig.1 に BPA 標準溶液のクロマトグラム (UV228nm) および UV スペクトルを、Fig.2 にコーン缶詰抽出液のクロマトグラムおよび UV スペクトルを示した。

BPA の添加回収率は、86.3-91.7%, R.S.D. も 2.5-4.0% で良好であった (Table1)。

C1-2. 食品缶詰中の BPA 濃度

果実缶では、17 検体中 1 検体で BPA を

検出したが、その他の検体は不検出であった (Table2)。

野菜缶 (野菜スープ缶を含む) においては、34 検体中 28 検体から 1 缶あたり、約 1-14 μg の BPA が検出された (Table3)。そのほとんどは、固形分からの検出であり、概ね 95% 以上の BPA が固形分から検出された。

また肉・魚介缶詰では、21 検体中 18 検体から約 2-22 μg/缶の BPA が検出された (Table4)。単位グラムあたりでは、油相部分から固形分と同等もしくは、それ以上の BPA が検出された。

今回調査した缶詰食品においては、堀江ら¹⁾および河村ら²⁾がすでに報告している飲料缶中の BPA 濃度 (コーヒー缶で約 40 μg/缶) を越すような缶詰はなかったものの、加熱殺菌の温度、時間が相対的に長い野菜缶や肉・魚介缶のほとんどの缶詰から BPA が検出された。また、缶の構造から結果をみるとプルトップ型 (*Easy Open Lid*) の缶詰で BPA が高く検出される傾向がみられたが、野菜、肉・魚介缶でプルトップ型でありながらも、BPA の検出しない缶詰もあった。これらの缶詰のほとんどは、ビスフェノール F 型のエポキシ樹脂を使用していると思われた。飲料缶では BPA の溶出しない改良缶が市場に多く出回るようになってきているが、それに比べ、食品缶詰においては改良が 1 歩遅れていると思われた。

C-2. BADGE および BADGE・HCl, BADGE・2HCl の分析

BADGE は、缶詰の内面コーティング剤で使用されているエポキシ樹脂のモノマーであり、また塩化ビニル樹脂の安定剤 (塩化水素の補促剤) として使用されている。

BADGE およびその加水分解物については、現在のところ内分泌攪乱作用の報告はなされていないが、その構造中に BPA を有していることから今後注目すべき物質である。

肉・魚介缶詰を中心とした 20 検体について、BADGE および脂溶性の高い 2 種類の塩化水素付加体である BADGE・HCl 体および 2HCl 体について同時分析を行った。

抽出法およびクリーンアップ法は BPA と同一方法で可能であったが、HPLC 注入液として、移動相から、メタノール溶液に変更した。これは、BADGE および BADGE・HCl が、エポキシ環構造を持っているため水溶液中で不安定であり、容易に加水分解するためである。BADGE の加水分解の性質について調べたところ、メタノール溶液中で非常に安定であり、精製水中と比べると 90 倍程度加水分解速度は小さいことがわかった。さらに、今回採用した HPLC 条件では、分析中に加水分解物はほとんど生成せず、また添加回収実験の結果 (Table1) から試料調製中の加水分解はほとんどなく、分析が可能であると思われた。

BADGE・HCl は、標準品が市販されていないため、BADGE と食塩水を混和し調製した。また、定量は、BADGE・2HCl の検量線を用いて行った。

Fig.3 に標準溶液のクロマトグラムおよび主なサンプルのクロマトグラムを示した。

C-2-2. 食品缶詰中の濃度

BADGE は、水溶液中で不安定であり容易に加水分解物を生成することから、今回は、脂肪や油の含有率の高い肉・魚介缶詰を中心に 20 検体について調べた。その結果を Table5 に示した。

BADGE が 20 検体中 3 検体 ($0.6\text{--}4\mu\text{g/缶}$)、BADGE・2HCl が 9 検体 ($0.1\text{--}47\mu\text{g/缶}$)、BADGE・HCl が 3 検体 ($0.1\text{--}2\mu\text{g/缶}$) から検出された (検出限界 $5\text{--}10\text{ppb/}$ 蛍光検出器)。

BADGE および BADGE・HCl, 2HCl が同時に検出されたのは、3 検体でコーン 2 検体およびツナ缶であった。コーン缶においては、液汁があるにも関わらず、BADGE および BADGE・HCl が微量検出された。これは、缶内面コーティング剤から溶出した BADGE が、加水分解を受ける前にコーンの脂肪等に吸着されたものと考えられた。またツナ缶では、固形分からはほとんど検出されず、油相から検出された。

BADGE・2HCl は、他の 6 検体からも検出された。これらの缶詰からは、BPA は検出されるものの BADGE や BADGE・HCl は検出されなかった。BADGE・2HCl が検出された検体のすべてがプルトップ型の缶詰であり、これらの缶詰に塩化ビニル樹脂が使用されていると考えられた。また、BADGE・2HCl のみ検出される要因として、コーティング剤の製造工程において、塩化ビニルの量に対して、BADGE の量が少なかったため、あるいは過剰な加熱温度、時間で製造したためにほとんどの BADGE が BADGE・2HCl に変換したものと考えられた。今後、缶の材質の確認と共にこれら物質の動態について検討していきたい。

【D. 結論】

缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行したビスフェノール A の分析法について検討し、缶詰 72 検体について分析を行った。その結果、72 検体中 47 検体からビス

フェノール A が約 1-22 μ g/缶検出され、缶詰食品は、ビスフェノール A のヒトへの主要な暴露源として考えられた。また、検出された缶詰のほとんどは、加熱処理条件の厳しい野菜缶および肉・魚介缶であり、10 μ g/缶以上検出された缶詰（9 検体）はすべてプルトップ型の缶詰であった。

さらに、20 検体について、BADGE および 2 種類の塩化水素付加体（HCl 型、2HCl 型）について分析したところ、BADGE が 3 検体（0.6-4 μ g/缶）、BADGE・2HCl 型が 9 検体（0.1-47 μ g/缶）、BADGE・HCl 型が 3 検体（0.1-2 μ g/缶）から検出された。

【E. 研究業績】

- 1 学会発表：「缶詰食品中のビスフェノール A およびビスフェノール A ジグリシジルエーテルの同時分析」全国衛生化学技術協議会（福岡），1999.11.4-5
- 2 論文発表：「Determination of Bisphenol A in Canned Food」, Food Additives and Contaminants, 投稿中

【参考文献】

- 1) 堀江 正一ら：分析化学, 48, 579 (1999)
- 2) 河村 葉子ら：食衛誌, 40, 158 (1999)