

平成 12 年度厚生科学研究

「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明」

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 エーテル関連物質の分析

主任研究者	星薬科大学	中澤 裕之
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
		堀江 正一
		吉田 栄充

【研究要旨】

缶詰の内面コーティング剤から食品に移行したビスフェノール A (BPA) およびビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE) 関連物質の一斉分析法を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 蛍光検出器を用いて検討した。

構築した分析法を基に、主としてプルトップ型の缶詰 30 検体 (野菜缶 17、果実缶 2、魚介缶 11) について分析を行ったところ、BPA は 30 検体中 22 検体から検出され (0.3 ~ 12.8 $\mu\text{g}/\text{缶}$)、BADGE の加水分解体である BADGE $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は、全缶 (ただしビスフェノール F ジグリシジルエーテル (BFDGE) 型塗装缶を除く) から検出された (1.0 ~ 27.4 $\mu\text{g}/\text{缶}$)。また、BADGE の塩化水素付加体である BADGE $\cdot 2\text{HCl}$ が 7 検体 (0.7 ~ 4.8 $\mu\text{g}/\text{缶}$) から、BADGE $\cdot \text{H}_2\text{O}\cdot \text{HCl}$ が 21 検体 (0.6 ~ 22.0 $\mu\text{g}/\text{缶}$) からそれぞれ検出された。

今年度、少数ではあるが飲料缶同様、BPA 溶出の低減化が図られた改良缶が確認され、また、BFDGE 型のエポキシ缶と思われる缶詰も確認された。

【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の 1 つである。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、これらプラスチック製品からの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。

缶詰においては、エポキシ樹脂が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、エポキシ樹脂のスターティングモノマーである BPA および BPA を構造中に有するビスフェノール A ジグリシジルエーテル (以下

BADGE) 等が缶詰食品中に移行している可能性がある。

平成 11 年度の当研究において、缶詰食品への BPA および一部の BADGE 関連物質の移行を明らかにしたが、今年度は高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC) - 蛍光検出器を用いた BPA および加水分解体を含めた BADGE 関連物質の一斉分析法について検討した。さらに缶詰食品についてこれら化学物質のヒトに対する暴露量を把握するためにこの一斉分析法を基に分析を行った。


【B.研究方法】

B-1 . BPA および BADGE 関連物質の一斉分析法

B-1-1 . 対象とした化学物質

今年度一斉分析の対象とした化学物質は以下の7種類である。

- ・ BPA
- ・ BADGE モノマー
- ・ BADGE モノマー加水分解体 (BADGE・H₂O および BADGE・2H₂O)
- ・ BADGE モノマー塩化水素付加体 (BADGE・HCl および BADGE・2HCl)
- ・ BADGE モノマー加水分解体-塩化水素付加体混合物 (BADGE・H₂O・HCl)

BADGE 関連物質の構造式については、 図 1 に示した。

B-1-2 . 試料

市販の缶詰 30 検体について分析を行った (果実缶 2 検体、野菜缶 17 検体、魚介缶 11 検体)。プルトップ (Easy Open Lid) 型の缶詰を主に収集した。

B-1-3 . 試薬

BPA 標準品 : 4、4'-isopropylidene-di-phenol (環境分析用、関東化学(株)製)

BADGE : Bisphenol A diglycidyl ether (Fluka 社製)

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

BADGE・2H₂O : Bisphenol A bis (2,3-dihydroxypropyl) ether (Fluka 社製)

BADGE・H₂O、BADGE・H₂O・HCl およ

び BADGE・HCl については、標準品が市販されていないため、BADGE のメタノール溶液に 1%塩化ナトリウム溶液を加え、遮光下で室温放置し、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。

脱水ピリジン : 有機合成用 (関東化学(株)製)

無水酢酸 : 特級 (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 5mL で前洗浄を行った。

B-1-4 . 試験溶液の調製

缶詰食品は、固形分、液相 (液汁)、油相に分離し、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-1-4-1 固形試料

固形試料 10g (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、残さはアセトニトリル 30mL で洗浄した。ろ過後、ヘキサン 50mL と 10 分間振とうし、アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層はさらにアセトニトリル 50mL と 10 分間振とうした後、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合わせた。アセトニトリル層は減圧下 40℃ で乾固した。残留物はメタノール 3mL に溶解し、精製水 10mL を加えた後、OASIS HLB カートリッジに負荷した。40%メタノール溶液 10mL で洗浄後、メタノール 6mL で

溶出した。溶出液は減圧濃縮し、最終的にメタノール2mLに定容した。そのうち1mLはガスクロマトグラフ-質量分析計（以下GC-MS）によるBPAの確認試料とし、残液の10 μ LをHPLCに注入した。

B-1-4-2 . 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 6mL で溶出した。溶出液は減圧濃縮後、メタノール 2mL に定容した。以後の操作は、固形分の試料調製法に準じた。

B-1-4-3 . 油試料

静置分離した油 2.5 g をヘキサン 30mL で希釈し、アセトニトリル 60mL を加え、ヘキサン-アセトニトリル分配を2回行った。アセトニトリル層は新たなヘキサン 50mL と10分間振とうし、アセトニトリル層を分取した。残ったヘキサン層はアセトニトリル 50mL と再振とうし、アセトニトリル層を合わせ、さらに乾固後、OASIS HLB カートリッジでクリーンアップを行った。最終液量をメタノール 1mL とした。0.5mL をGC-MS用の試料溶液とし、残液の10 μ LをHPLCに注入した。

B.1-4-4 . アセチル化体の調製

GC-MS用の試料溶液は減圧下 40 $^{\circ}$ C で乾固した。残留物に脱水ピリジン溶液 0.5mL および無水酢酸 0.5mL を加え溶解後、60 $^{\circ}$ C で20分間インキュベートした。反応終了後、5%メタノール溶液 5mL を混和した後、ヘキサン 3mL で2回抽出を行った。ヘキサン

層は減圧濃縮乾固後、ヘキサンで定容（等倍量）し、その1 μ LをGC-MSに注入した。

B-1-5 . HPLC 測定条件

機器：JASCO Gulliver System（日本分光）

カラム：Discovery RP-Amide C16
（4.6 \times 250mm）

移動相：A液；アセトニトリル/水 = 25/75
B液；アセトニトリル/水 = 75/25

0min、A/B = 80/20 17min、A/B = 45/55
25min、A/B = 40/60 26min、A/B = 0/100
流速：1.0mL/min

カラム温度：40

注入量：10 μ L

検出器：蛍光検出器

（Ex/Em = 275nm/300nm）

B-1-6 GC-MS（EI-SIM）測定条件

機器：HP5980-HP5989B（Agilent）

カラム：HP-5MS（0.25mm \times 30m \times 0.25 μ m）

温度：150（3min）10 $^{\circ}$ C/min 280（10min）

キャリアーガス流量：1.0mL（定流量）

注入量：1 μ L

注入口温度：250

インターフェース温度：280

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250

モニターイオン：312、213、270、228

【C . 結果および考察】

C-1 . BPA および BADGE 関連物質の一斉分析法

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体、塩化水素体については、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BPA同様、今後注目すべき物質である。

前年度、BPA および BADGE と BADGE 塩化水素体の分析に用いた前処理法は、前処理中に BADGE が加水分解を起こすことを懸念して順相系のクリーンアップ法を採用した。しかし、加水分解体についてはカラムの負荷条件や溶出条件等を検討したが、満足な結果が得られなかった。

そこで逆相系のクリーンアップ法について検討し、エポキシド環を有する BADGE、BADGE・HCl、BADGE・H₂O が分析操作中に加水分解を起こさないこと、さらに回収率およびクリーンアップ効果を考慮して検討した結果、固相抽出カートリッジとして OASIS HLB カートリッジを選択し、また負荷後の洗浄液を 40%メタノール溶液 10mL、溶出液をメタノール 6mL とした。

また今回採用した HPLC 条件では、分析中に加水分解物はほとんど生成せず、添加回収実験の結果（表 1）からも試料調製中の加水分解はほとんどないと考えられ、分析が可能であると思われた。

BADGE・HCl、BADGE・H₂O および BADGE・H₂O・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 5 日間、遮光下で室温放置した後、OASIS HLB カートリッジで脱塩、濃縮してメタノール溶液として調製した。図 2 に 1%塩化ナトリウム溶液中における BADGE 関連物

質生成物の経時変化を示した。

定量は BADGE・H₂O および BADGE・H₂O・HCl は BADGE・2H₂O の検量線を、また BADGE・HCl は BADGE・2HCl の検量線を用いて行った。

図 3 および図 4 に標準溶液のクロマトグラムおよび主なサンプルの HPLC クロマトグラムを示した。

定量限界は、固形分および液相で 10ppb、油相で 20ppb であった。

BPA に関しては、HPLC 蛍光検出器法およびアセチル化 GC-MS-SIM 法の 2 法を用いて定量を行った。両法における BPA の定量値の比較を行ったが、GC-MS-SIM 法（m/z 312：アセチル化-BPA（親化合物）、m/z 213：2 つのアセチル基および 1 つのメチル基が取れたフラグメント）による定量値がやや高いものの概ね良好な結果が得られた（表 2）。

BADGE 関連物質の多くは構造中にアルコール性水酸基を有しており、アセチル化による GC-MS での確認を試みたが、感度および再現性が悪く分析が不可能であった。

さらに BADGE 関連物質 - アセチル化体を HPLC-蛍光検出器を用いて確認する方法も試みた。約半数の試料で定量値の相関も良く可能なものもみられたが、試料によってはアセチル化をすることで夾雑物の影響を受け、確認、定量が困難であった。BADGE 関連物質の確認としては、LC-MS を用いた確認が必要であると思われた。

また、BPA、BADGE、BADGE・HCl および BADGE・2HCl に関しては、昨年度のプロリジルを用いた分析法と定量値の比較を行ったところ、極めて良好な相関が得られた（表 3）。

C1-2 . 食品缶詰中の濃度

化合物別の食品缶詰中の濃度を表 5 に示した。

C1-2-1 . 食品缶詰中の BPA 濃度

今回分析した試料 30 検体中 22 検体 (果実缶 0/2、野菜缶 13/17、魚介缶 9/11) から BPA を検出した。

缶詰食品中の濃度は、1 缶当たり 0.3 ~ 12.8 μg (HPLC 蛍光検出器) であったが、昨年度の調査で BPA を検出した同一商品の一部 (コーンおよびツナの缶詰) で BPA が検出されなかった (約 50ng/g のものが今回 10ng/g 以下)。これら商品の内面コーティング剤の材質には変化はなく、未反応の BPA が少ないエポキシ塗料が使用されていると考えられた。

野菜・魚介水煮缶において BPA は固形分から検出されたが、液相からは検出されなかった (10ppb 以下)。一方、魚介油漬缶においては、単位グラムあたり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ついては、まだ少数であるが飲料缶同様 BPA の溶出の低減化が図られた缶詰が見られ、改良缶詰の切り替えの過渡期と思われた。

C-2-2-2 . BADGE \cdot 2H₂O 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、水系の缶詰中では、缶内面コーティング剤から溶出した BADGE は、BADGE として存在できずそのほとんどが最終加水分解体の BADGE \cdot H₂O として存在することが容易

に推察される。実際、今回調査したすべての缶詰 (ビスフェノール F ジグリシジルエーテル型エポキシ樹脂によるコーティング缶を除く、後述) から、BADGE \cdot 2H₂O (1 缶当たり、1.0 ~ 27.4 μg) を検出した。特に果実缶では、19.2 ~ 24.5 μg /缶と胴体部が未塗装にもかかわらず高く、単位グラム (mL) 当りの移行量はやや液相に多い傾向があった。野菜缶では固形分に液相の約 2 ~ 6 倍移行していた。また油相からは検出されなかった。

C-2-2-2 . BADGE \cdot H₂O の濃度

BADGE \cdot H₂O 体に関してはすべての缶詰において 10ppb 以下 (油相で 20ppb 以下) であった。BADGE \cdot H₂O は、BADGE \cdot 2H₂O 生成の加水分解中間物質でエポキシド環を 1 つ、水酸基を 2 つ有していることから食品中では非常に不安定なために検出されなかったと考えられた。

C-2-2-3 . BADGE \cdot HCl の濃度

今年度の検体で BADGE \cdot HCl が検出されたものはなかった。前年度 BADGE \cdot HCl を検出 (約 15ng/g 固形分) したコーンの缶詰は、BPA 溶出の低減化が図られていたものであり、他の BADGE 関連物質についても同様に低減していた。

C-2-2-4 . BADGE \cdot 2HCl の濃度

BADGE \cdot 2HCl は 30 検体中 7 検体から検出された (0.7 ~ 4.8 μg /缶)。今回、BADGE \cdot 2HCl が検出された缶詰は、すべて野菜缶詰の固形分からで、プルトップの内面コーティング剤に塩化ビニル樹脂が配合されたものもしくは 3 ピース缶であった。

塩ビコーティング剤の場合、加熱時に発生する塩化水素の捕捉剤として意図的にBADGEを使用することが知られており、その結果、塩化水素を捕捉したBADGEはBADGE・2HClとなる。このBADGE・2HClがコーティング剤中に残存し、そのまま製缶された場合、食品充填後の加熱滅菌処理によって食品へ移行することが推察された。

また、3ピース缶においては、缶詰の各片（ふた、底、胴体、サイドシーム）について、内面コーティング剤を削った後、メタノールで5分間超音波溶出を行い、残存のBADGE・2HClを調べたところ、ふた片あるいはサイドシーム片、もしくはその両方から残存のBADGE・2HClを確認した（6～112ng/cm²）。これらの材質は、FT-IRで確認したところすべてエポキシ樹脂であった。一概にエポキシ樹脂と言っても、使用される場所によりその特性の異なったエポキシ樹脂が使用されることが考えられ、そのエポキシ樹脂を合成する際に生成した不純物としてのBADGE・2HClが製品の加熱殺菌時に溶出したものと推察された。

C-2-2-5 . BADGE・H₂O・HCl の濃度

BADGE・H₂O・HClは30検体中21検体（野菜缶13/17、魚介缶8/11）から検出された。その量は1缶あたり野菜缶で1.7～22.0μg、魚介缶で0.6～3.6μgであり、有意に野菜缶が多かった。概ね80ppb以上検出した7検体はすべてBADGE・2HClを同時に検出した。

BADGE・H₂O・HClが検出された缶詰の缶詰片をメタノールで溶出したところ、残存のBADGE・H₂O・HClを検出したものはそれほど多くなかったが、BADGE・HClが

ふた片もしくはサイドシーム片から検出された。

BADGEが容易に加水分解されることから、食品中のBADGE・H₂O・HClの多くは、エポキシ樹脂合成時の不純物であるBADGE・HClが溶出後、加水分解を起こしてBADGE・H₂O・HClになったものと考えられた。

BADGE・H₂O・HClは、主として固形分から検出され、液相（9ng/mL程度のもの2検体あり）、油相からはほとんど検出されなかった。

C-2-2-6 . BADGE の濃度

BADGEの食品缶詰について魚介油漬缶の油相からの検出報告がなされているが、今回の検体からBADGEは検出されなかった。前年度BADGEを検出した缶詰は、今回の分析の結果、BPAの低減化が図られた改良缶であり、同時にBADGE関連物質も低減化されていた。

C-2-2-7 .ビスフェノールFジグリシジルエーテル（BFDGE）関連物質

この一斉分析法を用いて缶詰の分析を行ったが、3つの缶詰で図5に示したようなクロマトグラムが得られた（HPLC-蛍光検出器）。

これらの複数のピーク群は、BFDGEおよびその加水分解体、塩化水素体であると推察された。しかし、夾雑物が多いためBADGE関連物質の定量は不可能であった。

【D . 結論】

缶詰の内面コーティング剤から食品に移行したビスフェノールA（BPA）およびビ

スフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE) 関連物質の一斉分析法を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 蛍光検出器を用いて検討した。

構築した分析法を基に、主としてプルトップ型の缶詰 30 検体(野菜缶 17、果実缶 2、魚介缶 11) について分析を行ったところ、BPA は 30 検体中 22 検体から検出され(0.3 ~ 12.8 $\mu\text{g}/\text{缶}$)、BADGE の加水分解体である BADGE $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は、全缶(ただしビスフェノール F ジグリシジルエーテル (BFDGE) 型塗装缶を除く) から検出された(1.0 ~ 27.4 $\mu\text{g}/\text{缶}$)。また、BADGE の塩化水素付加体である BADGE $\cdot 2\text{HCl}$ が 7 検体(0.7 ~ 4.8 $\mu\text{g}/\text{缶}$) から、BADGE $\cdot \text{H}_2\text{O}\cdot \text{HCl}$ が 21 検体(0.6 ~ 22.0 $\mu\text{g}/\text{缶}$) からそれぞれ検出された。

なお、少数ではあるが飲料缶同様、BPA 溶出の低減化が図られた改良缶が確認され、また、BFDGE 型のエポキシ缶と思われる缶詰も確認された。

【E. 研究業績】

- 1 論文発表：“Determination of Bisphenol A in Canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography”、*Food Additives and Contaminants*、**18**、p69-75、2001.