報 文

液体クロマトグラフィー/質量分析法による缶飲料中の ビスフェノール A の定量

堀江 正一^{®*}, 吉田 栄充^{*}, 石井 里枝^{*}, 小林 進^{*}, 中澤 裕之^{**}

Determination of bisphenol A in canned drinks by LC/MS

Masakazu HORIE, Terumitsu YOSHIDA, Rie ISHII, Susumu KOBAYASHI^{*} and Hiroyuki NAKAZAWA^{**}

^{*}Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Urawa, Saitama 338-0824

^{**}Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-0063

(Received 14 January 1999, Accepted 18 February 1999)

A simple and rapid method using liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS) has been developed for the determination of bisphenol A in canned drinks. LC separation was carried out on a Zorbax XDB-C18 column (150 × 2.1 mm) using 0.01% acetic acid-acetonitrile (60 : 40) as the mobile phase at a flow rate of 0.2 ml/min. The negative ionization produced a typical (M - H)⁻ molecular ion of bisphenol A (*m/z* 227). The calibration graph for bisphenol A was rectilinear from 10 to 1000 pg with a detection limit by selected ion monitoring (SIM) of about 5 pg. Samples were cleaned up on a Isolute Multimode cartridge (500 mg). The recovery of bisphenol A from beverages fortified at levels 5 and 50 ng/ml was 85.4 ~ 96.3%, with high precision. Bisphenol A concentrations of canned drinks were N.D. ~ 212.1 ng/ml. The limit of quantification of bisphenol A in canned drinks was 0.5 ng/ml, except for coffee drinks.

Keywords : bisphenol A; LC/MS; epoxy resin; migration; canned drinks.

1 緒 言

今日、我々は膨大な数の化学物質に囲まれて生活しており、工業用化学物質をはじめ、農薬、食品添加物などは、我々の日々の暮らしの中で不可欠なものとなっている。しかし、一方ではこれら化学物質のヒトや野生生物に対する内分泌攪乱作用が問題となっている。

ビスフェノール A (BPA) は、内分泌攪乱化学物質として環境庁よりリストアップされた 67 物質の一つで、

ポリカーボネート (PC) やエポキシ樹脂の原料として多用されている。その国内生産量は 1996 年度で約 25 万トンであり、リストアップされた 67 物質の中で第 3 位を占めている。BPA がエストロゲン作用を示す化学物質であることは、既に 1938 年に合成ホルモン、ジェチルスチルベストロール (DES) の発見者である Dodds ら¹⁾により明らかにされている。しかし、BPA が内分泌攪乱化学物質として注目され出したのは、Krishnam ら²⁾により PC 製実験器具から微量溶出した BPA がヒト乳ガン細胞 MCF-7 を増殖させると報告されてからと言える。

化学物質によるヒトへの影響は、個々の化学物質がど

^{*} 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県浦和市上大久保 639-1

^{**} 星薬科大学: 142-0063 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Operating Conditions of LC-MS

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)		MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 × 2.1 mm)	Eluent	0.01% acetic acid-MeCN (60 : 40)
Fragmentor	80 V	Flow rate	0.2 ml/min	Oven temp.	40°C
Nebulizer	N ₂ (35 psi)	Injection size	10 µl		
Drying gas	N ₂ (10 l/min, 350°C)				
V-cap	4250 V				
SIM ion	<i>m/z</i> 227				

の程度毒性を有しているか、またその化学物質にどの程度暴露されているかにより決定される。すなわち、化学物質のリスク評価を行う上で、暴露評価は有害性の評価と同様、重要な要素である。したがって、BPAの暴露源であるPC製容器やエポキシ塗装缶からの溶出実態調査は重要と思われる。既に、容器及び缶詰食品からの溶出に関しては、河村ら³⁾及びBrotonsら⁴⁾により報告されているが、缶飲料からの報告はほとんど見られない。

一般に、河川水や底質などの環境試料中のBPAの分析は、トリメチルシリル (TMS) 化後、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) で測定されている^{5)~7)}。一方、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) は、誘導体化せずにそのまま測定できることから、UV検出器や蛍光検出器を用いた方法がPC製容器からのBPAの溶出検査等には用いられている³⁾⁴⁾⁸⁾。しかし、BPAの吸収極大波長は227 nmと短波長領域にあり、缶飲料中のBPAを高感度分析するにはきょう雑成分の影響を受け、困難である。また、蛍光検出法は一般に選択性、検出感度に優れているが、BPAの蛍光性は乏しく、蛍光検出法も缶飲料中のBPAの高感度分析法には適切でなかった。

最近、新たな分離分析法として、HPLCの検出器に豊富な定性情報を提供する質量分析計 (MS) を直結したLC/MSが食品分析にも用いられている⁹⁾。そこで、今回選択性及び検出感度に優れているLC/MSを用いて缶飲料中のBPAの分析法を検討し、併せて市販缶飲料の含有量調査を実施した。

2 実験方法

2.1 試料及び試薬

試料は埼玉県内で市販されている缶飲料 (コーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料、炭酸飲料など) を用いた。

標準品: BPAは関東化学製の環境分析用試薬を用いた。

標準溶液: 標準品 100 mgを精ひょうし、メタノール 100 mlに溶解して標準原液を調製し、適宜 HPLC 移動

相で希釈して標準溶液とした。

Isolute Multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd. 製、カートリッジはあらかじめメタノール 5 ml 及び水 5 ml でコンディショニングした後、使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

2.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS): Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用し、Table 1 に示した条件で測定した。

2.3 検量線の作成

BPA の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100 ng/ml の溶液を調製し、その 10 µl を LC/MS に注入する。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し、モニターイオン *m/z* 227 により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

2.4 試験溶液の調製

試料 10 ml を採り、Isolute Multimode カートリッジに負荷し、水 20 ml で洗浄した後、40% アセトニトリル 5 ml で溶出して試験溶液とした。

2.5 空缶の溶出試験

2.5.1 95°C 溶出試験 缶中の飲料をほかに移し、上ぶたを取り除いた後、缶を水でよく洗浄する。浸出溶液には水を用い、95°C の熱水を缶に満たし、アルミはくでふたをした後、95°C の恒温槽に 30 分間放置する。

2.5.2 121°C 溶出試験 95°C 溶出試験に用いた缶を水で軽く洗浄した後、水を缶に満たし、アルミはくでふたをした後オートクレーブで 121°C、15 分間加熱する。

Fig. 1 Effect of the concentration of acetic acid in mobile phase on the intensity of the $(M-H)^-$ ion of bisphenol A

3 結果及び考察

3.1 LC/MS 測定条件の検討

3.1.1 移動相の影響 BPA は 2 個のフェノール基を有する極めて弱い酸性化合物である。そこで、インターフェースには微極性化合物のイオン化にも適したエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を選択し、イオン化モードはネガティブモードとした。本条件により BPA の擬分子イオン $[M-H]^-$ (m/z 227) が高感度で観測された。ESI によるイオン性化合物のイオン化は、移動相の pH により影響される。すなわち、目的化合物が移動相中で既にイオン化状態にあるとき、感度が高くなる。したがって、ネガティブモードの場合、移動相は塩基性 (BPA の pK_a は約 10 と報告¹⁰⁾されている、一般に目的化合物の pK_a より溶液の pH が 2 高いこと) が望ましい。ところが、BPA の場合、移動相の液性が中性領域においても高感度で検出することが可能であった。なお、Fig. 1 に示すように、移動相に微量の酢酸を加えることにより、BPA はより感度良く検出されたが、酢酸の濃度が高くなるに従い検出感度は低下した。

3.1.2 フラグメンター電圧の影響 ESI はマイルドなイオン化法であり、化合物の分子量情報は得やすいが、構造情報には乏しい面がある。そこで、衝突誘起解離 (collision induced dissociation, CID) を起こして構造情報 (フラグメントイオン) を得る方法が利用されている。キャピラリー出口の電圧 (フラグメンター電圧) を上げることにより、フラグメントイオンが生成し、逆に擬分子イオン強度は低下した。そこで、フラグメンター電圧の設定であるが、BPA の定量には擬分子イオンを効率良く生成する 80 V に、BPA の確認にはフラグメ

Fig. 2 LC/ESI-MS spectra of bisphenol A at fragmentor voltages of 80 and 160 V

ントイオンを生成する 160 V に設定した (Fig. 2)。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、Table 1 に示す条件を設定した。本条件によって得られた BPA の検出限界は、SIM モードでモニターイオンを BPA の擬分子イオンとした場合、0.2 ng/ml (絶対量として 2 pg) であった。

3.1.3 SIM の分析精度 擬分子イオン $[M-H]^-$ を選んだ SIM により BPA の検量線を作成した。検量線は 10 pg ~ 1 ng の範囲で良好な直線性 ($r = 0.999$) を示した。また、各注入量 (10, 20, 50, 100, 1000 pg) における測定を 5 回行い、ピーク面積の相対標準偏差を求めたところ、いずれの注入量においても 2% 以内であり、満足できる分析精度を得ることができた。

3.2 前処理法の検討

Biles ら¹¹⁾は、ミルクあるいは大豆をベースにした乳児用缶詰中の BPA のクリーンアップにスチレン-ジビニルベンゼン共重合体充填カートリッジを採用し、カートリッジから BPA をジクロロメタンを用いて溶出している。また、最近環境庁より示された暫定マニュアル⁵⁾では、ジクロロメタンを用いた液液分配、あるいは Biles らと同様、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体充填カートリッジ等を用いて BPA を抽出した後、シリカゲルカラムでクリーンアップを行う方法を採用している。しかし、これらの方法はいずれも有機塩素系溶媒、ジクロロメタンを使用しており、操作も簡便とは言えな

Fig. 3 LC/ESI-MS SIM chromatograms of (A) standard bisphenol A (50 pg), (B) coffee drink extract, (C) tea drink extract and (D) coffee drink extract in which bisphenol A was detected at 152 ng/ml

い。そこで、現在試料の前処理に多用されている固相抽出法を用いて、より簡易な方法を検討した。

BPA は疎水性が高いこと、及び缶飲料はほとんどが水であることから、抽出用カートリッジには逆相系を中心に検討した。検討したカートリッジの中では、無極性の ODS (C18) と強陽イオン (ベンゼンスルホン酸) 及び強陰イオン (四級アミン) 交換樹脂の 3 種類がミックスして充填されている Isolute Multimode がクリーンアップ効果に最も優れていた。なお、カートリッジからきょう雑成分の溶出を極力抑制するため、40% のアセトニトリル 5 ml で BPA を溶出した。本法を用いることにより、コーヒー類を除き、Fig. 3 に示すとおりきょう雑物質の影響のない試験溶液を調製することができた。コーヒー飲料については BPA 溶出近くにきょう雑成分が溶出されるため、今後更にきょう雑成分の除去法を検討する必要がある。

当研究所にはイオン交換水と超純水製造装置があり、当初カートリッジのコンディショニング及び洗浄にイオン交換水を用いた。しかし、イオン交換水を用いた空試験において BPA と思われるピークが観測された。そこで、ジクロロメタンを用いてイオン交換水中の疎水性成分を液液抽出し、LC/MS に供した結果、イオン交換水中に BPA が微量 (0.5 ~ 1 ng/ml) 含まれていることが分かった。BPA はエポキシ樹脂や PC の原料が主な用途であるが、このほかにポリマー製品の酸化防止剤や安定剤としても使用されている。したがって、ポリマー製品を使用しているイオン交換水製造装置や前処理用器材の

Table 2 Recovery of bisphenol A from beverages

Sample	Added/ng ml ⁻¹	Recovery, %
Coffee (milk)	5	85.4 ± 7.3
	50	87.4 ± 2.8
Tea (milk)	5	92.1 ± 3.0
	50	91.1 ± 0.7
Japanese tea	5	92.3 ± 1.7
	50	96.3 ± 1.0
Fruit drink	5	85.8 ± 3.3
	50	87.1 ± 2.1

Values are mean ± S.D. (n = 5).

使用に当たっては、当該ポリマー製品からの BPA の溶出に注意を要すると考える。

3.3 添加回収実験

市販の PET ボトル入りの飲料 (コーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料) に BPA を 5 及び 50 ng/ml の濃度に添加し、回収率を求めた。Table 2 に示すとおり、各試料に対する回収率はいずれも平均で 85% 以上であり、標準偏差 (SD) はおおむね 5% 以内と、分析法として満足できる結果が得られた。なお、コーヒー飲料抽出液中の BPA は、標準溶液に比べて約 25% 感度が低下した。この原因の一つとして、前述したように BPA の溶出付近に溶出する試料由来成分の影響が考えられる。このことから、コーヒー飲料に関しては、試料抽出液を用いて検量線を作成した。本法による定量限界は、コーヒ

Table 3 Concentration of bisphenol A in canned coffee drinks and result of migration test

No.	Sample	Brand	Content/g	Can		Bisphenol A		Migration data/ng ml ⁻¹	
				Material	Type	Concentration/ng ml ⁻¹	Total/ $\mu\text{g can}^{-1}$	95°C, 30 min	121°C, 15 min
1	Coffee (milk)	A	250	Steel	Old	7.1	1.8	0.10	1.50
2	Coffee (milk)	A	190	Steel	Old	7.3	1.4	0.06	2.50
3	Coffee (milk)	B	170	Steel	Old	17.8	3.0	0.07	2.90
4	Coffee (milk)	B	170	Steel	Old	10.9	1.8	0.11	2.25
5	Coffee (milk)	C	190	Steel	Old	59.5	11.3	1.05	27.70
6	Coffee (milk)	C	190	Steel	Old	58.5	11.1	0.72	21.20
7	Coffee (milk)	C	190	Steel	Old	31.9	6.1	0.33	15.40
8	Coffee (milk)	D	190	Steel	Old	212.1	40.2	0.30	14.00
9	Coffee (milk)	D	190	Steel	Old	193.3	36.7	0.88	14.80
10	Coffee (milk)	D	190	Steel	Old	152.1	28.9	0.63	10.70
11	Coffee (black)	D	190	Steel	Old	169.5	32.2	1.31	20.00
12	Coffee (milk)	D	250	Steel	Old	145.2	36.3	0.51	14.00
13	Coffee (milk)	E	190	Steel	Old	3.9	0.7	0.08	3.10
14	Coffee (milk)	F	190	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	0.15
15	Coffee (milk)	F	250	Steel	Old	5.3	1.3	0.08	0.85
16	Coffee (milk)	G	250	Steel	Old	73.7	18.4	0.53	16.60
17	Café au lait	H	190	Steel	Old	5.0	1.0	<0.05	1.08
18	Coffee (milk)	I	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
19	Coffee (milk)	I	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
20	Coffee (milk)	I	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
21	Coffee (milk)	I	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
22	Coffee (milk)	I	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
23	Coffee (milk)	J	190	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.08
24	Coffee (milk)	K	250	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	0.85
25	Coffee (black)	K	185	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	<0.05
26	Coffee (black)	D	900	PET	—	N.D.	—	—	—

N.D.: Not detected (<2 ng/ml)

Table 4 Concentration of bisphenol A in canned tea drinks and result of migration test

No.	Sample	Brand	Content/g	Can		Bisphenol A		Migration data/ng ml ⁻¹	
				Material	Type	Concentration/ng ml ⁻¹	Total/ $\mu\text{g can}^{-1}$	95°C, 30min	121°C, 15min
1	Tea (black)	A	340	Steel	Old	1.0	0.3	0.87	4.20
2	Tea (milk)	A	340	Steel	Old	70.0	23.8	0.42	14.50
3	Tea (milk)	B	280	Steel	Old	15.0	4.2	<0.05	2.45
4	Tea (milk)	B	340	Steel	Old	15.2	5.2	0.11	2.50
5	Tea (lemon)	B	340	Steel	Old	4.7	1.6	1.00	17.30
6	Japanese tea	B	340	Steel	Old	11.0	3.7	<0.05	1.10
7	Tea (milk)	C	340	Steel	Old	129.2	43.9	0.33	8.40
8	Tea (black)	C	340	Steel	Old	12.9	4.4	<0.05	2.50
9	Tea (milk)	C	340	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	1.00
10	Tea (milk)	D	280	Steel	Old	14.7	4.1	0.21	1.50
11	Tea (milk)	A	280	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
12	Japanese tea	C	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
13	Japanese tea	C	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
14	Tea (milk)	E	280	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
15	Japanese tea	E	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
16	Healthy tea	F	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
17	Healthy tea	G	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
18	Healthy tea	H	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
19	Chinese tea	I	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
20	Japanese tea	J	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	<0.05
21	Tea (milk)	A	500	PET	—	N.D.	—	—	—
22	Tea (black)	A	500	PET	—	N.D.	—	—	—
23	Tea (milk)	C	500	PET	—	N.D.	—	—	—
24	Japanese tea	J	500	PET	—	N.D.	—	—	—

N.D.: Not detected (<0.5 ng/ml)

Table 5 Concentration of bisphenol A in canned fruit soft drinks and result of migration test

No.	Sample	Brand	Content/g	Can		Bisphenol A		Migration data/ng ml ⁻¹	
				Material	Type	Concentration/ng ml ⁻¹	Total/ μ g can ⁻¹	95°C, 30min	121°C, 15min
1	Fruit drink	A	225	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	17.10
2	Fruit drink	A	225	Steel	Old	N.D.	—	0.45	12.70
3	Fruit drink	A	225	Steel	Old	N.D.	—	0.15	10.95
4	Fruit drink	A	225	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	7.70
5	Fruit drink	A	225	Steel	Old	N.D.	—	0.17	11.30
6	Fruit drink	B	190	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	9.70
7	Fruit drink	C	225	Steel	Old	N.D.	—	0.30	8.00
8	Carbonated drink	C	350	Steel	Old	N.D.	—	<0.05	2.55
9	Carbonated drink	C	350	Steel	Old	N.D.	—	3.35	60.50
10	Fruit drink	D	190	Steel	Old	N.D.	—	0.08	27.85
11	Vitamin drink	E	350	Steel	Old	N.D.	—	0.02	3.10
12	Orange juice	F	190	Steel	Old	N.D.	—	0.15	12.50
13	Fruit juice	F	190	Steel	New	N.D.	—	2.27	88.30
14	Apple juice	F	190	Steel	New	N.D.	—	5.70	62.50
15	Carbonated drink	G	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.15
16	Carbonated drink	G	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.10
17	Carbonated drink	G	340	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.20
18	Carbonated drink	H	350	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.20
19	Carbonated drink	H	350	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.20
20	Sports drink	H	350	Steel	New	N.D.	—	<0.05	0.30
21	Carbonated drink	I	350	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	1.20
22	Fruit drink	I	350	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	0.80
23	Sports drink	J	340	Aluminum	—	N.D.	—	0.17	0.80
24	Fruit drink	K	350	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	0.43
25	Fruit drink	L	245	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	0.65
26	Fruit drink	L	280	Aluminum	—	N.D.	—	0.10	3.30
27	Beer	M	350	Aluminum	—	0.7	0.2	0.07	2.70
28	Beer	M	500	Aluminum	—	0.6	0.3	0.10	3.00
29	Beer	N	350	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	2.35
30	Beer	N	500	Aluminum	—	N.D.	—	<0.05	0.30

N.D.: Not detected (<0.5 ng/ml)

一類を除き 0.5 ng/ml ($S/N=3$), コーヒー飲料はきょう雑成分の影響を考慮して 2 ng/ml とした。

3・4 市販缶飲料中の BPA 濃度

飲料缶の内側は、金属の溶出による味や臭いの変化を防ぐ目的でエポキシ系塗料などでコーティングされており、BPA の溶出が危ぐされている。そこで、先に確立した LC/MS を用いて市販飲料缶中の BPA 含有量を調べた (Table 3~5)。

飲料缶からの BPA の溶出は、加圧・加熱殺菌される缶から比較的高く溶出されるとされている。一般にコーヒー、紅茶などの缶飲料は加圧・加熱殺菌されている。今回得られた分析結果からも、コーヒー類や茶類は、他の加圧・加熱殺菌工程がないと思われる飲料缶に比べて高い濃度で BPA が検出された。なお、BPA が高く検出されたコーヒー飲料 No. 8 及び紅茶飲料 No. 7 についてロットの異なる缶の BPA 濃度を調べた結果、ロット差 {それぞれ 205.7 ± 18.0 , 118.1 ± 11.2 ($n=3$)} による変動は少なかった。

飲料缶製造時のエネルギーを節約する目的で、数年前からスチールの両面にポリエステル系フィルムをラミネートしたエポキシ塗料を用いない新しいタイプの缶が開発され、年々新タイプ缶の占める割合が増えている¹²⁾。エポキシ塗料を用いない新タイプ缶の中には“缶の底が白く、接合部がない”など外観から識別のつくものがある。しかし、ふたの部分は従来どおりエポキシ塗料が用いられている。Table 3, 4 に示すとおり、従来タイプに比べ、新タイプ缶を用いたコーヒー及び茶類飲料からは BPA はほとんど検出されなかった。一方、加圧・加熱殺菌処理のない果実飲料、炭酸飲料等では両者とも BPA はほとんど検出されなかった (Table 5)。

3・5 市販缶からの BPA の溶出試験

次に、上ぶたを取り除いた缶に 95℃ の熱水を満たし、BPA が溶出されるか調べた。Table 3~5 に示すとおり、コーヒー及び茶類飲料では従来タイプの缶からは微量溶出されたが、新タイプ缶からの溶出はいずれも検出限界以下 (0.05 ng/ml; 注入量 50 μ l) であった。一方、果実飲料、炭酸飲料缶からは 1 ng/ml 以上溶出された缶が 3 例と、コーヒー及び茶類飲料缶より高い溶出量であった。

更に、95℃ 溶出試験に用いた缶に水を満たし、オートクレーブで 121℃, 15 分間加熱処理して溶出量を調べた (Table 3~5)。コーヒー及び茶類飲料では、従来タイプの缶からは 10 ng/ml 以上溶出されたものも見ら

れたが、新タイプ缶からはいずれも検出限界以下であった。従来タイプの缶からの溶出量は、缶飲料中の BPA 含量が高いものほど、多く溶出される傾向が見られた。一方、果実飲料、炭酸飲料缶では、缶飲料中に BPA はほとんど検出されなかったが、加圧・加熱溶出することにより、多くの缶から BPA が溶出された。このことから、前述したように缶からの BPA の溶出は、加圧・加熱殺菌工程時に缶コーティング剤から飲料中に移行するものと推察される。

3・6 缶飲料からの BPA の摂取量

米国環境保護庁 (EPA) は、BPA の RfD (reference dose, 一日許容摂取量, ADI に相当) を $0.05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ としている¹³⁾。動物実験により求めた BPA の最小毒性影響量 (LOAEL) $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ に安全係数 1/1000 を乗じたものである。日本では、EPA によるリスク評価を踏まえて、食品衛生法により PC 製食品容器からの BPA の溶出基準を 2.5 ppm に設定している。これは平均体重 50 kg の日本の成人が摂取する一日当たりの食物摂取量を 1 kg として算出されたものとされている ($0.05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1} \times 50 \text{ kg} = 2.5 \text{ mg/day}$, $2.5 \text{ mg/食物摂取量 } 1 \text{ kg} = 2.5 \text{ ppm}$)。しかし、現在のところ金属缶からの BPA の溶出に関する基準は設定されていない。

今回調査した缶飲料の中で BPA が最も高く含まれていたものはコーヒー缶で 1 缶当たり約 40 μ g、紅茶缶で約 44 μ g であった。最も BPA が含まれていた缶飲料を成人が一日当たり 1 缶摂取したとすると、対 ADI 比は 1.8% ($44/2500$) となる。従来のリスク評価では問題とされないレベルであるが、Nagel ら¹⁴⁾は、最小毒性量 50 mg/kg より微量の BPA (体重当たり 2 及び 20 μ g) を妊娠マウスに摂取させたところ、生まれた雄マウスの生殖能力に影響が見られたと報告している。すなわち、従来の毒性評価では問題と成りえなかった微量領域における影響の発現である。なお、Nagel らの報告に対する信ぴょう性については賛否両論があり、現在追試がいくつかの研究機関においてなされている。

Colborn ら¹⁵⁾が著した“*Our Stolen Future*” (奪われし未来) が端緒となり、内分泌攪乱化学物質問題が大きな社会問題となった。内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響は危険な状態にあるのか、あるいは問題になるレベルではないのか、いずれとも判断できる段階にないと思われるが、社会に提起されている問題は深刻であり、事実の解明が望まれる。

文 献

- 1) E. C. Dodds, W. Lawson: *Proc. Royal Soc. Lon. B.*, **125**, 222 (1938).
- 2) A. V. Krishnam, P. Starhis, S. F. Permush, L. Tokes, D. Ferdman: *Endocrin.*, **132**, 2279 (1993).
- 3) 河村葉子, 小谷野有希, 武田由比子, 山田 隆: 食品衛生学雑誌, **39**, 206 (1998).
- 4) J. A. Brotons, M. F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza, N. Olea: *Environ. Health Persp.*, **103**, 608 (1995).
- 5) 環境庁水質管理課編: “外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル” III-8, (1998).
- 6) M. del Olmo, A. Gonzalez-Casado, N. A. Navas, J. L. Vilchez: *Anal. Chim. Acta*, **346**, 87 (1997).
- 7) A. Gonzalez-Casado, N. Navas, M. del Olmo, J. L. Vinchez: *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 565 (1998).
- 8) J. E. Biles, T. P. McNeal, T. H. Begley, H. C. Hollifield: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3451 (1997).
- 9) 堀江正一, 中澤裕之: ふんせき (*Bunseki*), **1996**, 36.
- 10) C. A. Staples, P. B. Dorn, G. M. Klecka, S. T. O'Block, L. R. Harris: *Chemosphere*, **36**, 2149 (1998).
- 11) J. E. Biles, T. P. McNeal, T. H. Begley: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4697 (1997).
- 12) 今津勝宏: ジャパンフードサイエンス, **34**, No. 2, 38 (1995).
- 13) L. H. Keith: “*Environmental Endocrine Disruptors*”, p. 265 (1997), (J. Wiley & Sons, New York).
- 14) S. C. Nagel, F. S. vom Saal, K. A. Thayer, M. Dhar: *Environ. Health Persp.*, **105**, 70 (1997).
- 15) T. Colborn, D. Dumanoski, J. P. Myers: “*Our Stolen Future*”, (1996), (Dutton, New York).

要 旨

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いた缶飲料中のビスフェノール A (BPA) の簡易かつ迅速な定量法を検討した。BPA は構造中にフェノール性の水酸基を有する弱酸性の化合物であることから、イオン化モードにはネガティブモードを採用した。LC 条件は、カラムに Zorbax XDB-C18 (150 × 2.1 mm, i.d.), 移動相には 0.01% 酢酸-アセトニトリル (60 : 40) を用い、流量は毎分 0.2 ml とした。検出には BPA の擬分子イオン $[M-H]^-$ m/z 227 を用いた。試料の前処理法は固相抽出法を採用し、カートリッジには無極性相、陽イオン交換相及び陰イオン交換相が混合充填された Isolute Multimode カートリッジ (500 mg) を用いた。本法におけるコーヒー、紅茶、果実飲料などに対する添加回収率は 5 及び 50 ppb の添加で 85% 以上、検出限界はコーヒー飲料を除き 0.5 ppb であった。