調査・資料

魚肉・畜肉缶詰中のビスフェノール A の
HPLC による分析法の検討

(平成 11 年 1 月 11 日受理)

瀧野 昭彦* 津田 泰三* 小嶋美穂子*
原田 浩之* 村木 一枝* 和田 稔*Development of Analytical Method for Bisphenol A in Canned Fish
and Meat by HPLCAkihiko TAKINO, Taizo TSUDA, Mihoko KOJIMA, Hiroyuki HARADA,
Kazue MURAKI and Minoru WADA(Shiga Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science: 13-45,
Gotenhama, Ohtsu, Shiga 520-0834, Japan)

An analytical method was developed for bisphenol A (BPA) in canned fish and meat. A sample was extracted with 150 mL of ethyl acetate and the organic layer was washed with 150 mL of 5% NaCl solution. After defatting by *n*-hexane/acetone partition, the extract was loaded on a 10% water-dehydrated silica gel column, washed with 100 mL of 15% acetone/*n*-hexane and eluted with 50 mL of 60% acetone/*n*-hexane. The eluate was evaporated to dryness and dissolved in methanol. BPA was analyzed by HPLC [column, Wakosil 5C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm); mobile phase, 60% methanol; detection, 230 nm; flow rate, 0.8 mL/min].

Recovery of BPA in 20 g of canned tuna steak (maguro steak) fortified with 1 µg of BPA was 89.9 ± 7.1 ($n=3$). Four kinds of canned fish and three kinds of canned meat on the market were analyzed for BPA with the developed method. The ranges of BPA content were N.D.~319 ng/g. The detection limit of BPA was 25 ng/g.

This method was effective for BPA in canned fish and meat and does not use solvents such as chloroform and dichloromethane.

(Received January 11, 1999)

Key words: 魚肉缶詰 canned fish; 畜肉缶詰 canned meat; ビスフェノール A bisphenol A; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; シリカゲルカラム silica gel column

緒 言

ビスフェノール A (以下 BPA とする) は、主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料として用いられており、環境庁が外因性内分泌攪乱化学物質としてリストアップしている 67 物質¹⁾の中の一つとなっている。

このため、各種試料中の BPA の分析が必要になり、水質、底質、水生生物試料中の分析方法については、平成 10 年 10 月に環境庁水質保全局水質管理課が「外因

性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」²⁾を定め、今後はこの分析方法によりモニタリング調査をすることになっている。

食品中の BPA の調査研究については野菜缶詰³⁾、乳児用調製濃縮液缶詰⁴⁾からの検出が報告されている。これらの報告では BPA の抽出精製方法として、野菜缶詰の場合、メタノール添加後、クロロホルム抽出、硫酸洗浄を行って測定に供している。乳児用濃縮液缶詰では、液汁を精製蒸留水で希釈し、そのままスチレン-ジビニルベンゼン系多孔質カートリッジカラムに負荷し、クロロホルムで溶出して抽出精製している。

* 滋賀県立衛生環境センター：〒520-0834 滋賀県大津市御殿浜 13-45

Scheme 1. Analytical method for bisphenol A in canned fish and meat

そこで、魚肉・畜肉缶詰中のBPAを対象に、抽出溶媒としてクロロホルム、ジクロロメタンを使用しないHPLCによる分析法について検討した。また、この方法を市販されている魚肉・畜肉缶詰7種に適用するとともに、抽出液をGC/MSによっても測定した。

実験方法

1. 試料

調査に用いた魚肉4種、畜肉3種の缶詰は滋賀県草津市内のスーパーマーケットで平成10年9月～10月に購入した。

2. 試薬

試薬は、それぞれ次のメーカーから入手した。BPA 鹿特級：関東化学(株)、酢酸エチル、ジクロロメタン(抽出兼水洗溶媒の検討に使用)、メタノール(以上、高速液体クロマトグラフ用)、アセトン、*n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン(TMS化に使用)、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム(以上、残留農薬分析用)、*N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロ

アセトアミド(BSTFA ガスクロマトグラフ用)、塩酸(有害金属測定用)：和光純薬工業(株)、水酸化ナトリウム特級：ナカライテスク(株)、シリカゲル 60 (70～230 mesh)：メルク

3. 装置及びその測定条件

3.1 高速液体クロマトグラフ

(株)島津製作所製ポンプ：LC-6A, 検出器：SPD-6 AV, システムコントローラー：SCL-6B, クロマトパック：C-R4A, カラム^{*1}：和光純薬工業(株)製 Wakosil 5C18 (4.6 mm i.d.×150 mm), 移動相：60% メタノール, 流速：0.8 mL/min, 注入量：20 μ L, 検出波長：230 nm

3.2 GC/MS

ガスクロマトグラフ：Varian 社製 3400, 質量分析計：Finnigan mat 社製 MAGNUM, カラム：J&W Scientific 社製 DB-1701 (0.53 mm, i.d.×30 m, 膜厚 1 μ m)

カラム温度：60°C (1 min)→10°C/min→200°C (0 min)→2°C/min→220°C (0 min)→10°C/min→270°C (30 min), 注入口温度：250°C, 検出器温度：270°C, キャリヤガス：He 10 mL/min, イオン化法：EI 法, イオン源温度：220°C, イオン化電圧：70 eV, 注入量：2 μ L

4. 10% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィー

150°C で2時間活性化させた後、デシケーター中で30分放冷したシリカゲルを底の広い容器を用いて重量を計り、その重量の9分の1の重さの蒸留水を均等に振りかけた。スパーテルで塊をつぶした後、これを栓のできる容器に移し替え、約1時間振とう器で混合した。

こうして調製した10% 含水シリカゲル 5 g を内径 15 mm×長さ 300 mm のクロマト管に15% アセトン含有 *n*-ヘキサンで湿式充てんし、その上に無水硫酸ナトリウム 5 g を積層した。

5. 抽出液の調製

均一にした魚肉・畜肉缶詰の内容物 20 g を計り採り、無水硫酸ナトリウム 10 g, 酢酸エチル 100 mL を加えて、2分間ホモジナイズした。上澄液を無水硫酸ナトリウムを2 cm 積層したガラスろ過器(3G2)に通して分液漏斗 500 mL に流し込み、残留物に酢酸エチル 50 mL を加えて同じ操作を行った。併せた酢酸エチルを5% 塩化ナトリウム水溶液 150 mL で水洗し、1時間以上静置した。

酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、エバポレーターで濃縮・乾固し、残留物を *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 60 mL で分液漏斗 100 mL に洗い込んだ。これに *n*-ヘキサン 20 mL を加えて5分間振とう

^{*1} 桃園裕子, 石橋正博: 第30回全国衛生化学技術協議会年会講演集 p. 72 (1993).

Table 1. Recovery of BPA in Organic Solvent from Distilled Water

Extract solvent	Recovery (%)	Extract solvent	Recovery (%)
Ethyl acetate	97.0±2.8	Dichloromethane	93.3±5.9
20% EA/H	88.4±3.3	50% EA/H	92.7±5.6
30% E/H	93.6±4.5		

Extract solvent: 150 mL, Distilled water: 150 mL

Fortified amount: 1 μ g

20% EA/H: 20% Ethyl acetate/*n*-hexane, 50% EA/H: 50% Ethyl acetate/*n*-hexane

30% E/H: 30% Diethyl ether/*n*-hexane

Data are the means±SD for 3 experiments.

し、上下層が十分に分離後、下層を別の分液漏斗 100 mL に採り、*n*-ヘキサンを加えて同じ操作を繰り返した。

下層をエバポレーターで濃縮・乾固し、残留物を 15% アセトン含有 *n*-ヘキサン 5 mL に溶かし、無水硫酸ナトリウムを積層した 10% 含水シリカゲルクロマトグラフに負荷した。15% アセトン含有 *n*-ヘキサン 100 mL で洗浄後、60% アセトン含有 *n*-ヘキサン 50 mL で BPA を溶出させた (Scheme 1)。

BPA を HPLC で測定する場合は、溶出液を乾固後メタノール 1 mL に溶解し、GC/MS で測定するときは、

6.2 GC/MS による定量によって TMS 化を行った。

6. 定 量

6.1 HPLC による定量

BPA 50 mg をアセトン 50 mL に溶かして、標準原液 1,000 μ g/mL を調製した。これをアセトンで希釈し、標準溶液 1~10 μ g/mL とした。

次に、標準溶液をヒーティングブロックを用い 40°C で加温しながら、窒素気流下で乾固し、メタノール 1 mL に溶解し、試験溶液とした。検量線は、1 次回帰式を用いた。

6.2 GC/MS による定量

BPA の標準原液をアセトンで希釈し、1~5 μ g/mL の標準溶液を調製した。この溶液 1 mL を共栓付き試験管に採り、ヒーティングブロックを用い 40°C で加温しながら、窒素気流を吹き付けて、溶媒を除去・乾固した。実試料の場合、10% 含水シリカゲルカラムからの溶出液を濃縮後、上記と同様にして乾固した。

次に平成 7 年度環境庁化学物質分析法開発調査報告書⁵⁾に準じて、BPA の TMS 化を行った。

すなわち、ジクロロメタン 0.5 mL を加えて乾固物を溶解し、その後 *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) 0.2 mL を加えて栓をし、激しく振り混ぜ、15 分間室温で反応させた。反応後、再び上記と同様に窒素気流で溶媒を除去・乾固した。これに *n*-ヘキサンを加えて残留物を溶かし容量を 1 mL にし、試験溶液とした。

定量は *m/z* 191, 207, 357 の 3 種のモニタリングイオンを用いてそれぞれ SIM 法により行った。検量線は *m/z* 191, 207 については、1 次回帰式で、また、*m/z* 357 は、2 次回帰式を適用するほうが相関が良かったので、2 次回帰式で計算した。

結果及び考察

1. 抽出法の検討

抽出溶媒としては、BPA に溶解性を有することが必要条件となる。そこで、まず、*n*-ヘキサン、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、*n*-ヘキサンと酢酸エチルとの混合溶媒及び *n*-ヘキサンとジエチルエーテルとの混合溶媒について BPA の溶解性を調べた。

すなわち、共栓付き試験管に (混合) 溶媒 50 mL を採り、そこに BPA 50 mg を加えて栓をし、1 分間激しく振り混ぜ、BPA が溶ける溶媒を BPA 易溶性とした。単独の溶媒では、*n*-ヘキサンを除いて BPA に易溶性を示した。混合溶媒の 20% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン、30% ジエチルエーテル含有 *n*-ヘキサンは易溶性を示した。

ここでは、BPA 易溶性溶媒の中から濃縮や溶媒転溶なしに次の水洗が可能な水と混合しない溶媒 5 種について BPA 添加後、蒸留水で洗浄し有機層に存在する BPA の割合を調べた (Table 1)。

20% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンの保持率が 88.4% であったほかは、すべて 90% 以上の保持率があり、その中でも酢酸エチルが 97.0% と最も良好であった。また、ジクロロメタンは人体に有害であること、*n*-ヘキサンを含有する溶媒は酢酸エチルと比べて、水洗時の分離が良好でないため、ここでは酢酸エチルを抽出に用いることとした。以下の実験では抽出溶媒として酢酸エチルを用いた。

なお、BPA はアルカリ性水溶液中ではフェノール性 OH 基の解離のため、ジクロロメタン抽出率が低下すると報告⁵⁾されているが、実試料の酢酸エチル抽出液を水洗した場合、水層の pH は、約 4 であった。そこで、pH 調整は不要と判断した。

Fig. 1. Effect of NaCl concentration on BPA extraction

Ethyl acetate: 100 mL

NaCl aqueous solution: 100 mL

Fortified amount: 1 μ g

Data are the means for 3 experiments.

Table 2. Recovery of BPA by *n*-Hexane/Acetonitrile Partition

H/AN	20 mL/60 mL		20 mL/100 mL	
Number of times (Hexane layer is exchanged)	2	3	2	3
Recovery (%)	92.1 $\pm$ 4.2	52.9 $\pm$ 7.5	91.8 $\pm$ 3.6	50.5 $\pm$ 1.7

Fortified amount: 1 μ g

H/AN: *n*-Hexane/acetonitrile saturated with *n*-hexane

Data are the means $\pm$ SD for 3 experiments.

2. 水洗時の塩化ナトリウム添加効果

0, 5, 10, 15% の各濃度に調製した塩化ナトリウム水溶液に BPA を添加し、酢酸エチルで抽出したところ、抽出率は塩化ナトリウム濃度の増加とともに、若干低下する傾向を示した (Fig. 1).

一般に、塩析操作は塩化ナトリウムの添加により目的化合物に水和している水分子をはぎとって、目的化合物を有機層へ移行しやすくするために行われる。しかしながら、BPA の場合、塩化ナトリウム濃度を上げると逆に有機層への移行が若干低下した。BPA のフェノール性 OH 基にイオンが会合し、そのために有機層への移行が低下するのではないかと考えられた。

しかしながら、実試料の酢酸エチル抽出液の水洗において、塩化ナトリウム無添加のとき、一部の試料で強いエマルジョンが形成されることがあった。そこで、魚肉・畜肉缶詰の分析時には、5% 塩化ナトリウム水溶液で水洗することとした。なお、5% 塩化ナトリウム水溶液で水洗することで、エマルジョンの形成は防止できた。

3. *n*-ヘキサン/アセトニトリル分配

脱脂効果を高めるため、アセトニトリル層をそのままにしておき、*n*-ヘキサン層を換えていく脱脂操作につい

て検討した (Table 2).

分配を 3 回行うと保持率が約 50% に低下したが、2 回の分配では、BPA はアセトニトリル層へ 90% 以上保持できた。そこで、*n*-ヘキサン層の入れ替えは 2 回が適当と考えられた。

また、*n*-ヘキサンと *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルとの容量比は 1:3 と 1:5 では BPA の保持率に差はなかった。脱脂効果を高めるためには、*n*-ヘキサン量の *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル量に対する比率を大きくするほうが望ましいと考えられるので、*n*-ヘキサン 20 mL, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 60 mL で分配することとした。

4. 10% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製

操作の簡便性からまず、カートリッジカラムによる精製を調べた。ある程度極性を有する物質の精製に用いられることが多い Sep-Pak plus NH₂ を使用して、魚肉・畜肉缶詰のアセトニトリル分配まで行った抽出物を 15% アセトン含有 *n*-ヘキサン 10 mL で溶解して負荷し、70% アセトン含有 *n*-ヘキサン 10 mL で溶出した。この条件では HPLC のチャート上に BPA のピークと重

Table 3. Elution Pattern (%) of BPA from Silica Gel Columns

Elution solvent	50% A/H	60% A/H	70% A/H
0~ 50 mL	73.0±16.6	92.8±2.7	89.8±2.5
50~100 mL	0.0± 0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

After wash with 100 mL of 15% acetone/*n*-hexane, 10% water-deactivated silicagel columns were eluted with 50, 60, 70% acetone/*n*-hexane.

Fortified amount: 1 µg, A/H: Acetone/*n*-hexane

Data are the means±SD for 3 experiments.

Fig. 2. HPLC chromatograms

A) boiled tuna in oil (katsuo aburazuke)

B) cooked horsemeat (sakuraniku yamatoni)

HPLC conditions column: Wakosil 5C18 4.6 mm×150 mm; mobile phase: 60% methanol; flow rate: 0.8 mL/min; detector: UV; wavelength: 230 nm

なるピークを除去できないことがあった。そこで、カラムクロマト管を使用し、均一な活性を期待できる含水シリカゲルを充てん剤に用いた溶出条件を検討した。

10% 含水シリカゲルを用いて、アセトン含有 *n*-ヘキサンでアセトンの割合を変えて、BPA の溶出状況を調べた。

10% 及び 15% アセトン含有 *n*-ヘキサンでは、100 mL 流下させても添加した BPA はクロマト管内に全量保持されていた。ところが、20% アセトン含有 *n*-ヘキサンでは 50~100 mL の画分に約 70% の BPA が溶出した。そこで、15% アセトン含有 *n*-ヘキサン 100 mL で洗浄することとした。

次いで、アセトンの含有率を高めて BPA の溶出状況

を調査した。50% アセトン含有 *n*-ヘキサンでは 0~50 mL の画分に添加した BPA の 73.0% が、また、60%、70% アセトン含有 *n*-ヘキサンでは 0~50 mL の画分にそれぞれ、92.8%、89.8% の BPA が溶出した。したがって、溶出は、60% アセトン含有 *n*-ヘキサン 50 mL とした (Table 3)。

5. HPLC 及び GC/MS による測定

HPLC の測定条件は、桃園らの報告^{*1} に準じた。測定波長の 230 nm 付近は、妨害ピークがよく現れる領域であるが、水煮、油漬缶詰はこの波長で比較的きれいなクロマトグラム (Fig. 2A) が得られた。

醤油、アミノ酸などの調味液で味付けされた缶詰では共雑ピークがクロマトグラム (Fig. 2B) 上に見られるこ

A)

Fig. 3 (A)

B)

Fig. 3 (B)

とがあったが、測定に支障はなかった。検出限界値は、実試料にBPAを添加し、各濃度での応答値のばらつきから計算⁶⁾により求め、25 ng/gとした。なお、BPAは、1~10 µg/mLの範囲で直線性を示した。

GC/MSによるBPA測定は、カラムなどへの吸着を防ぐため、TMS化して行われることが多い。TMS化したBPAは、分子イオン(m/z 372)から脱メチルした m/z 357を筆頭に、 m/z 207, 191に主要ピークを生ず

る。

Fig. 3A~3FにBPA標準品、かつお油漬、さくら肉大和煮のマススペクトル及びSIMクロマトグラムを示したが、かつお油漬、さくら肉大和煮はともにBPA標準品とマススペクトルが良く一致した。また、SIMクロマトグラムでも、標準品と同じくベースラインの安定したきれいなチャートが得られた。この結果からは、今回検討したBPAの抽出及び精製法が有効であることが

C)

Fig. 3 (C)

D)

Fig. 3 (D)

分かった。

GC/MS での検出限界値は、最小検量線値に相当する値、50 ng/g を検出限界値とした。

6. 添加回収実験

Scheme 1 に基づきまぐろステーキ 20 g に BPA を 1 μ g 添加した回収実験を行った (測定は HPLC による)。その結果は、 $n=3$ で回収率 $\pm$ 標準偏差が、89.9 $\pm$

7.1% であった (Table 4)。

7. 市販の魚肉・畜肉缶詰への適用

本分析法を市販の魚肉・畜肉缶詰 7 種類に適用した (Table 5)。

HPLC による測定では BPA は、7 種缶詰中、4 種から検出され、検出範囲は 71.7~319 ng/g であった。

同じ試料を GC/MS により測定したところ、 m/z

Fig. 3 (E)

Fig. 3 (F)

Fig. 3. Mass spectra and SIM chromatogramsA), D) TMS-bisphenol A ($2\mu\text{g/mL}$)

B), E) boiled tuna in oil (katsuo aburazuke)

C), F) cooked horsemeat (sakuraniku yamatoni)

GC/MS conditions column: DB-1701 $0.53\text{ mm} \times 30\text{ m}$, $1\mu\text{m}$; column temperature: 60°C (1 min) $\rightarrow 10^\circ\text{C/min} \rightarrow 200^\circ\text{C}$ (0 min) $\rightarrow 2^\circ\text{C/min} \rightarrow 220^\circ\text{C}$ (0 min) $\rightarrow 10^\circ\text{C/min} \rightarrow 270^\circ\text{C}$ (30 min); injection temperature: 250°C ; detector temperature: 270°C ; carrier gas: He 10 mL/min

Table 4. Recovery (%) of BPA by Proposed Method

Samples	No. 1	No. 2	No. 3	Means±SD
Tuna steak (Maguro steak)	84.1	88.9	96.7	89.9±7.1

BPA content of canned tuna steak was N.D. (<25 ng/g).

Canned tuna steak 20 g were fortified 1 µg of BPA.

Fig. 5. Bisphenol A Content (ng/g) in Canned Fish and Meat

Marker	Sample	HPLC	GC/MS		
			<i>m/z</i> 191	<i>m/z</i> 207	<i>m/z</i> 357
A	Boiled mackerel (Saba mizuni)	96.5	96.5	91.3	137
A	Cooked horsemeat (Sakuraniku yamatoni)	319	391	336	486
B	Tuna steak (Maguro steak)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B	Roast mutton (Yakiniku maton)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	Boiled tuna in oil (Katsuo aburazuke)	71.7	64.3	60.4	69.4
C	Roast horsemeat (Yakiniku sakuraniku)	132	122	126	131
D	Grilled herring (Nishin kabayaki)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: <25 ng/g for HPLC, <50 ng/g for GC/MS

Data of GC/MS were reference.

191, 207, 357 のどのモニタリングイオンを用いても BPA は、HPLC による測定と同じ 4 種から検出された。検出範囲は *m/z* 191 が 64.3~391 ng/g, *m/z* 207 が 60.4~391, *m/z* 357 が 69.4~486 ng/g であった。両法及び各モニタリングイオンでの測定値を比べると、さば水煮、さくら肉大和煮では *m/z* 357 用いた GC/MS による測定値のみが、ほぼ同レベルを示す他の 3 測定値より高めになったが、かつお油漬、焼肉さくら肉ではそれぞれ、60.4~71.7 ng/g, 122~132 ng/g の範囲であり、比較的一致していた。したがって、これにより HPLC による測定が市販の魚肉・畜肉缶詰中の BPA の分析に適用できることが分かった。

ま と め

タンパク質、脂肪、調味料など夾雑物を多量に含む魚肉、畜肉缶詰中の BPA の分析法について検討し、次の方法を得た。

酢酸エチル抽出→水洗→*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配→10% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィー→HPLC

まぐろステーキ 20 g に BPA を 1 µg 添加した回収実験では、回収率±標準偏差は 89.9±7.1% であった。本方法を用いて魚肉缶詰 4 種、畜肉缶詰 3 種を調査した

ところ、含有量は、N.D.~319 ng/g であった。検出限界値は、25 ng/g である。

なお、本分析法は、抽出に人体に有害であるジクロロメタン、クロロホルムを使用しないものである。

文 献

- 1) 環境庁 “外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED '98” 1998 年 5 月。
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課 “外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質、底質、水生生物)” 平成 10 年 10 月, p. III 8-III 25.
- 3) Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N., Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Persp.*, **103**, 608-612 (1995).
- 4) Bile, J. E., McNeal, T. P., Begley, T. H., Determination of bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4697-4700 (1997).
- 5) 環境庁 “平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書”。
- 6) 環境庁環境保健部保健調査室 “化学物質分析法開発マニュアル (案)” 昭和 62 年 3 月, p. 186-188.