

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書
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及び
動態研究

食品用ラップフィルム中における 4-ノニルフェノールの分析及びその動態解明

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授
研究協力者 吉村吉博 星薬科大学
井之上浩一 星薬科大学
加藤嘉代子 星薬科大学
牧野恒久 東海大学
岩崎克彦 東海大学
和泉俊一郎 東海大学

研究要旨

食品用ラップフィルムに内分泌系をかく乱することが示唆される化学物質の残存に関して注目され、その安全性を評価する必要がある。特に内分泌かく乱作用が指摘されている 4-ノニルフェノールが残存している報告があり、早急に調査研究を実施しなければならない。そこで食品用ラップフィルム中に残存する 4-ノニルフェノールに関する分析法の開発、溶出挙動の解明、改良型ラップフィルムの評価及びそのエストロゲン活性評価を実施した。

A. 研究目的

4-ノニルフェノール（NP）は、酸化防止剤（Tris (nonylphenyl) phosphite）や界面活性剤（Nonyl ethoxylates）等の分解物として、プラスチック製品に残存する可能性が示唆される。近年、その用途よりスーパーや一般家庭等で広く利用されている食品用ラップフィルムもその一つとして挙げられる。最近の報告で、ポリ塩化ビニル製品に最高 5、500 $\mu\text{g}/\text{g}$ の残存が確認されている¹⁾。内分泌かく乱化学物質として、代表的な化学物質である NP に関して、食品用ラップフィルム中残存や食品移行等調査しなければならない。そこで、NP に関しての新規分析法の開発及び食品用ラップフィルムを用いて、材質試験及び溶出試験を実施した。近年、開発された改良型ラップフィルムに関し

てもその調査研究を実施し、エストロゲン活性評価も行った。

B. 研究方法

B-1 試薬・試料

NP は環境分析用試薬（関東化学社製）を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒はシクロヘキサン（残留農薬試験用；関東化学社製）、2-プロパノール（HPLC 用；関東化学社製）、*n*-ヘプタン（残留農薬試験用；和光純薬社製）、メタノール（残留農薬試験用；和光純薬社製）を、精製水には日本ミリポア社製 Milli-Q（EDS ポリッシャー付き）で製したものをを用いた。移動相のアセトニトリル、リン酸はいずれも和光純薬社製、試薬特級を使用した。

NP はメタノールに溶解して 1.0 mg/ml の標準液を調製し、標準液を更にメタノール/水

(1/1 : V/V) で各種濃度に調製し、実験に供した。

また、測定試料として、業務用ラップフィルム 12 検体及び一般用ラップフィルム 18 検体の合計 30 検体。そのうち、ポリ塩化ビニル製ラップフィルムは 22 検体、ポリ塩化ビニリデン製ラップフィルムは 3 検体、ポリエチレン製は 3 検体、ポリプロピレン製が 1 検体、ポリオレフィン製が 1 検体 (Table 1)。

B・2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフとしてポンプ、恒温槽には日立社製 L-6300、ESA 社製 Column Heater、電気化学検出器 (ED) は ESA 社製 Coul Array MODEL 6210、データ処理は Coul Array System Win 32 を用いた。試料注入には Kontron Instruments 社製 Autosampler 460 を用いた。分離カラムには資生堂製 CAPCELL PAK UG 120 C₁₈ (4.6 × 250 mm) を使用した。

実験に用いるガラス器具はすべてメタノール洗浄後、200 °C、4 時間加熱して使用した。

B・3 測定条件

カラム温度を 40 °C とし、移動相にアセトニトリル/0.5 %リン酸水溶液 (65/35) を 1.0 ml/min で送液した。また、ED の各電圧は、NP に特異的かつ高感度検出が可能となるように設定した。試料注入量を 50 µl とした。各試料の LC 測定毎にメタノールを注入してブランクのモニタリングを行った。

B・4 材質・溶出試験及び食品移行について

材質試験^{1, 2)} : ハサミで細片にした試料 0.5 g を精秤し、シクロヘキサノール/2-プロパノール (1/1) 混液 10 ml を加え、室温で一昼夜放置後、この抽出液 1.0 ml を濃縮乾固した。その後、メタノール 5 ml で再溶解させ、メ

ンبرانフィルター (0.45 µm) でろ過したものを試験溶液とした。

溶出試験 : 試料が 5×5 cm² になるようにハサミで切り取り、それを *n*-ヘプタン 25 °C 条件下 60 分間放置した。抽出溶媒を濃縮乾固させた後、メタノールに再溶解させ、メンブランフィルター (0.45 µm) でろ過したものを試験溶液とした。また、他の溶出条件としては、水、60 °C、30 分を実施した。本溶媒は、そのまま測定用試験溶液とした。

食品移行 : 本研究では、抽出等が容易である米食品 (おむすび) を用いて、各種条件下で食品移行を検討した。

B・5 エストロゲン活性評価法

被検体測定には、和光純薬社製環境分析用 Estrogen-R(α) Competitor Screening Kit を用いた。また、測定機器 (蛍光リーダー) には、TECAN 社製 SPECTRA Fluor Plus を使用し、測定を実施した。

NP 及びエストラジオール標準液は、DMSO に溶解して 10⁻² M の標準液を調製し、標準液を更に DMSO で各種濃度 (10⁻⁴ ~ 10⁻¹⁰ M) に調製し、試料溶液とした。テストチューブに、114 µl の反応溶液と 6 µl の試料溶液を混合して ER 固相化マイクロプレートにこの溶液を 100 µl 移行した。また、A1、A2 ウェルにはブランク溶液 (DMSO 5 µl + 反応溶液 95 µl) の混液を添加した。2 時間放置後、規定の洗浄液で 2 回洗浄し、残り液を充分に取り除き、100 µl の測定溶液を添加して蛍光リーダーで測定を行った。蛍光リーダーの測定条件は、Ex. 485 nm、Em. 535 nm で検出条件を設定し、Gain: Optimal 及び Flash Number: 100 で行った。

固相化 ER に結合している蛍光エストラジオール量を蛍光検出で測定し、その強度が

50 %置換された時の試料濃度を IC_{50} として各試料の $ER\alpha$ 親和性を算出した。また、食品用ラップフィルム試料に関しては、材質試験用試料溶液を利用して、本実験に用いた。

C. 研究結果

C・1 LC/ED 測定条件の検討

C・1・1 移動相の検討

移動相には、アセトニトリル/リン酸水溶液を用い、リン酸濃度における検出感度の影響を検討した。NP のピーク面積と印加電圧をプロットしてハイドロダイナミックボルトモグラムを作成した (Fig. 1)。その結果、高い感度を得られた 0.5 %リン酸水溶液を用いて以下の実験を行うことにした。

C・1・2 検量線の作成

NP をそれぞれ 1.0~1000 ng/ml に調製し、その 50 μ l を注入して、得られた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。その結果、検出限界は 1.0 ng/ml (絶対量として 50pg, S/N=3) であった。検量線は 5~1000 ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数=0.998) が得られた。Fig. 2 に NP 標準品のクロマトグラムを示す。

C・1・3 実験用精製水における NP 汚染に関する検討

実験用に使用する水精製システムは各種プラスチックを利用しているため、NP 等のアルキルフェノール類汚染が懸念される。そこで、新規アルキルフェノール類及びビスフェノール A の水試料に関する分析法を構築し、実験用に利用する精製水中残存化学物質の測定を実施した。

その結果、従来利用していた Milli-Q REAGENT WATER SYSTEM により、精製された実験用水では、NP (0.03 ng/ml) 及びビスフェノール

ール A (0.05 ng/ml) が検出された。しかし、内分泌かく乱化学物質や有機揮発性化学物質測定用として、新たなシステムである Milli-Q gradient A10 Elix with EDS polisher system により、精製された実験用水においては、いずれの化学物質に対して、検出限界以下 (ND<0.01 ng/ml; ビスフェノール A 及び ND<0.02 ng/ml; NP) であった。

本実験においては、Milli-Q gradient A10 Elix with EDS polisher system で精製された実験用水を用いて、実施した。

C・2 材質試験

上記の条件において、試験溶液を LC-ED で測定した結果、試料中の残存量が 2000 μ g/g 以上であったのが 1 検体、1900~1500 μ g/g の範囲であったのが 1 検体、1400~1000 μ g/g の範囲であったのが 6 検体、900~500 μ g/g の範囲であったのが 3 検体の検出であった (Table. 2)。材質による違いは、ポリ塩化ビニル製のみから NP の残存が確認された。また、用途別による違いは、業務用 (9/12) 及び一般用 (2/18) の検出を得た。

C・3 溶出試験

上記の条件下で実験を実施した結果、*n*-ヘプタンでの溶出試験では、1.6~ND (<0.1) μ g/cm² の溶出量であった (11/30)。また、水の溶出試験では、37.5~ND (<1.0) ng/cm² の溶出量であった (10/30) (Table. 3)。

C・4 改良型ラップフィルム中残存 NP の分析

NP の残存が確認されたラップフィルムの新規改良型が開発され、そのラップフィルム中に残存する NP を材質試験により、調査した。その結果、改良型では NP の残存は確認されなかった (Fig. 3)。

C・5 食品移行に関する検討

食品用ラップフィルム (4 検体) におむす

びを包み、室温 30 分及び電子レンジ1分の条件下において、おむすびへの移行を検討した。測定対象は、ラップフィルムと接している表面部位及び全体の平均を換算して移行量を検討した。その結果は、Table 4 に示す。

C・6 食品用ラップフィルムのエストロゲン活性に関する評価

Estrogen-R (α) Competitor Screening Kit を利用して、食品用ラップフィルムのエストロゲン活性評価を実施した。本法を用いて、標準化学物質 (NP 及びエストラジオール) を評価した際、Fig. 4 のように活性が確認され、標識エストラジオールとの競合が確認された。つまり、本法を用いることにより、エストロゲン受容体 (α) との結合能が確認できる。

食品用ラップフィルム中残存物質がエストロゲン受容体との結合性を有するかの確認を実施した。その結果、NP の残存量との相関性が確認された (Fig. 4)。

D. 考察

NP の分析として LC/ED を用いることにより、高感度かつ選択的測定法を確立できた。この方法は、食品や生体試料への応用も可能であると思われる。

食品用ラップフィルムの NP 残存量の実態調査より、ポリ塩化ビニル製ラップフィルムより高い比率で検出された。また、材質試験に残存がみられたものは、各種溶媒による溶出が確認され、食品への移行が懸念される。また、溶出試験の結果から、脂溶性食品への移行のしやすいことが懸念される。

業界側の対応として NP の残存を減少された食品用ラップフィルムへの生産切り替えの実施を始めた。改良後と思われる生産ロツ

トは、NP の残存量も減少していることが判明した。しかし、切り替え後のラップフィルムでは、NP の代用添加剤等として内分泌かく乱作用を有する化学物質を利用していた場合、NP 残存量の調査のみでは、十分な評価法とは言い難い。そこで、新規評価法の基礎的検討として、残存添加剤の内分泌かく乱作用を総合的に評価する測定法の開発が望まれる。

エストロゲン活性評価法として、今回エストロゲン受容体バインディングアッセイ法を利用して、ラップフィルム材質試験溶液を希釈し、プレートに添加することにより、良好なエストロゲン受容体に対する競合反応が確認され、本法をさらに発展させ、総合的評価法として確立が可能と推測される。また、本法を用いて、従来型及び改良型のラップフィルムのエストロゲン受容体結合能を比較した際、NP 残存量との相関性が確認された。改良型のラップフィルムでは、そのエストロゲン受容体結合能がないことも示唆された。

E. 結論

NP の残存及び溶出に関しては、酸化防止剤として添加されたトリスノニルフォスファイトの分解によるものと思われる。この酸化防止剤は、主にポリ塩化ビニル製ラップフィルムに添加されているものと推定される。業務用ラップにポリ塩化ビニル製が多く利用しているため、その残存率が高かったものと推定される。一方、業界の対応としてこれらの酸化防止剤の使用を制限し、NP の溶出を抑えたラップフィルムに製造・販売の切り替えを始めている。つまり、改良されたラップフィルムに関しては、NP 溶出がほとんどないことも考えられ、今後はこれらの製品が市場に出てくると推定され、業界の NP 残存に

対する問題に対する対応は、良好な結果と思われる。しかし、その一方で可塑剤やその酸化防止剤の代用品に対しては、今後注意していく必要性があり、今回応用した単一化学物質の評価のみではなく、総合的化学品評価法の確立が望まれる。

参考文献

- 1) 河村ら；食衛誌 40.274 (1999)
- 2) 河村ら；食衛誌 40.189 (1999)

学会発表

第6回日本食品化学学会総会・学術大会；「食品用ラップフィルム中ノニルフェノールの分析とその実態」(2000)；井之上浩一、近藤幸子、矢島功、加藤嘉代子、中澤裕之(星薬大)、堀江正一(埼玉県衛生研究所)、平山クニ(神奈川県衛生研究所)

発表論文

- 1) K. Inoue, Y. Yoshimura, H. Nakazawa et al. "Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by LC-ED." *Analyst*, 125, 1959-1961 (2000)
- 2) K. Inoue, S. Kondo, Y. Yoshimura, M. Horie, H. Nakazawa, et al. "Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods." *Food Addit. Contam.* (in press, 2001)
- 3) K. Inoue, Y. Yoshie, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, et al. "Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples by LC-ED." *J. Chromatogr. A* (投稿中)

Table 1 食品用ラップフィルム試料リスト

サンプル番号	材質	用途
No.1	ポリ塩化ビニル	業務用
No.2	ポリ塩化ビニル	業務用
No.3	ポリ塩化ビニル	業務用
No.4	ポリ塩化ビニル	業務用
No.5	ポリ塩化ビニル	業務用
No.6	ポリ塩化ビニル	業務用
No.7	ポリ塩化ビニル	業務用
No.8	ポリ塩化ビニル	業務用
No.9	ポリ塩化ビニル	業務用
No.10	ポリ塩化ビニル	業務用
No.11	ポリ塩化ビニル	業務用
No.12	ポリ塩化ビニル	業務用
No.13	ポリ塩化ビニル	一般用
No.14	ポリ塩化ビニル	一般用
No.15	ポリ塩化ビニル	一般用
No.16	ポリ塩化ビニル	一般用
No.17	ポリ塩化ビニル	一般用
No.18	ポリ塩化ビニル	一般用
No.19	ポリ塩化ビニル	一般用
No.20	ポリ塩化ビニル	一般用
No.21	ポリ塩化ビニル	一般用
No.22	ポリ塩化ビニル	一般用
No.23	ポリ塩化ビニリデン	一般用
No.24	ポリ塩化ビニリデン	一般用
No.25	ポリ塩化ビニリデン	一般用
No.26	ポリエチレン	一般用
No.27	ポリエチレン	一般用
No.28	ポリエチレン	一般用
No.29	ポリプロピレン	一般用
No.30	ポリオレフィン	一般用

Table 2 食品用ラップフィルム中に残存する4-ノニルフェノールの分析

検出範囲	検出試料 (検出値 $\mu\text{g/g}$)
2000 $\mu\text{g/g}$ 以上	No.14(3300)
1900~1500 $\mu\text{g/g}$	No.9(1800)
1400~1000 $\mu\text{g/g}$	No.1(1400), No.4(1200), No.6(1200), No.7(1000) No.10(1400), No.13(1200)
900~500 $\mu\text{g/g}$	No.2(650), No.3(830), No.12(500)
ND ND<500 $\mu\text{g/g}$	No.5, No.8, No.11, No.15~30

Table 3 食品用ラップフィルム中の4-ノニルフェノール溶出試験

サンプルNo.	n-ヘプタン溶出量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	水溶出量(ng/cm^2)
1	0.89	4.6
2	0.58	2.4
3	0.64	5
4	0.75	3.5
5	ND ^{a)}	ND ^{b)}
6	0.92	9.6
7	0.69	6
8	ND	ND
9	1.13	20.3
10	1.01	18
11	ND	ND
12	0.33	5.7
13	0.53	ND
14	1.6	37.5
15	ND	ND
16	ND	ND
17	ND	ND
18	ND	ND
19	ND	ND
20	ND	ND
21	ND	ND
22	ND	ND
23	ND	ND
24	ND	ND
25	ND	ND
26	ND	ND
27	ND	ND
28	ND	ND
29	ND	ND
30	ND	ND

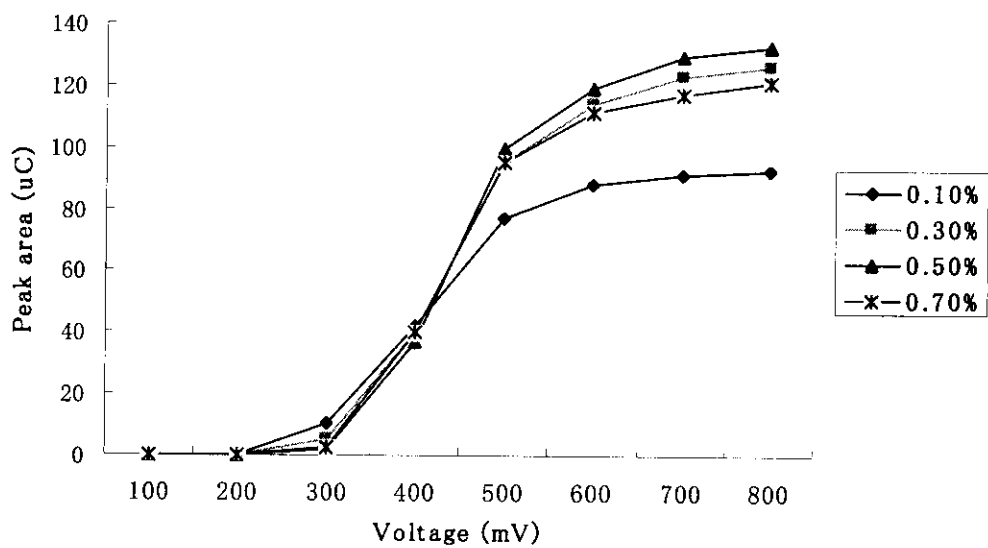
a) $\text{ND} < 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ b) $\text{ND} < 1.0 \text{ng}/\text{cm}^2$

Table 4 NP の食品（おむすび） への移行に関する検討

Sample No.	Content in rice (ng/g)			
	Outside of rice		Total	
	Case 1	Case 2	Case 1	Case 2
Control	ND	ND	ND	ND
14	410.0	76.5	171.8	35.0
9	80.6	19.0	34.3	7.6
1	57.3	13.1	24.4	5.2
16	ND	ND	ND	ND

Not detected (ND) < 1.0ng/g

Case 1: 電子レンジ条件下, 1分. Case 2:室温条件下, 30分.



Apply voltage: Ch₁ (50mV), Ch₂ (Detector voltage)

Fig. 1 ハイドロダイナミックボルタモグラム

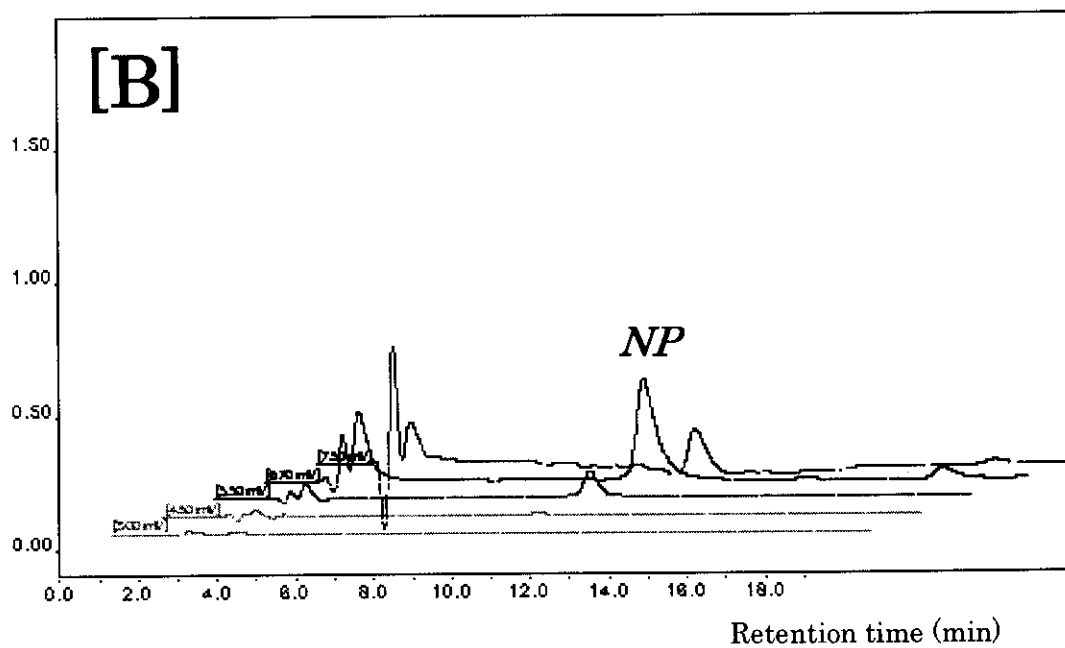
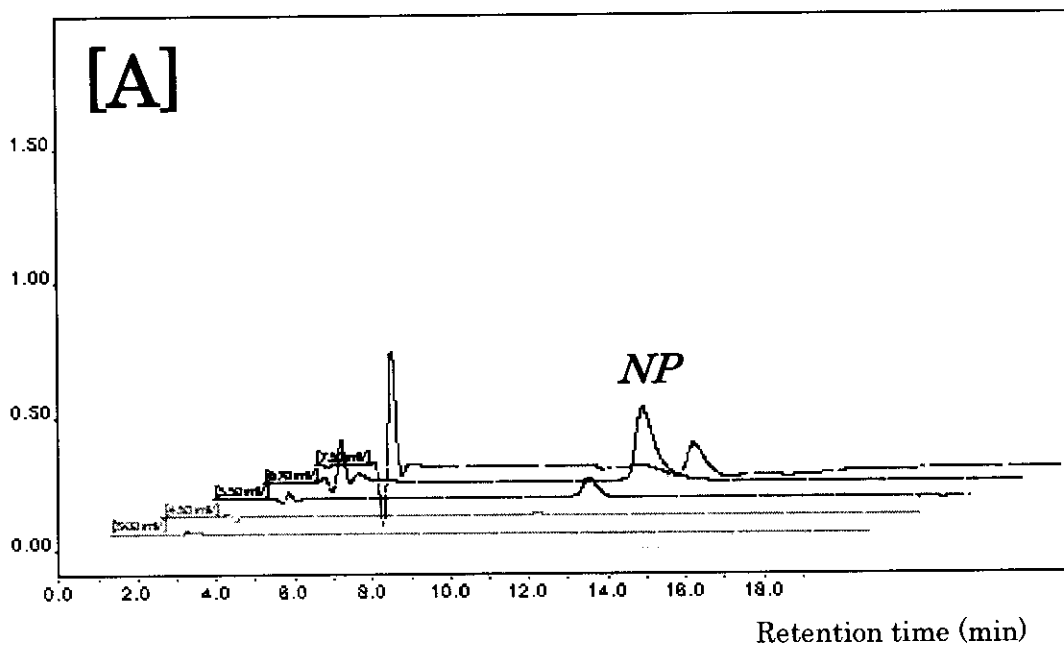
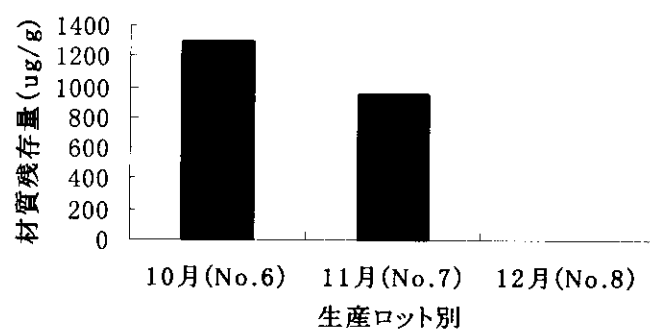


Fig. 2 LC/ED による NP のクロマトグラム (standard [A] , residue sample from PVC film for food-wrapping [B])

A社



B社

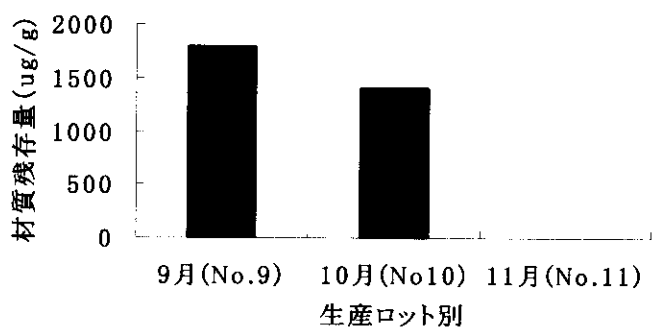
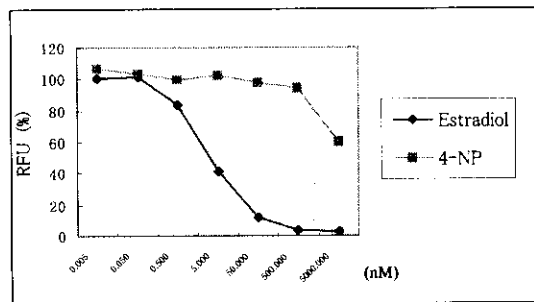
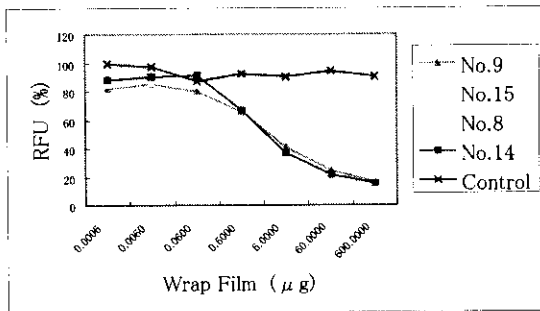


Fig.3 生産ロット別 NP 残存量



Sample No.	IC ₅₀ (μg)	Residue of NP(μg/g)
No. 9	2.0	1800
No. 15	-	ND
No. 8	-	ND
No. 14	2.7	3300

(ND<500 μg/g)

Fig.4 Estrogen-receptor (α) competitor screening を用いたエストロゲン作用

評価

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

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及び動態研究

缶ビール中のビスフェノールAに関する研究

-LC/MS/MS 法による分析法開発と缶ビール・缶体・塗料試料の分析-

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究協力者 池田 満雄、渋谷 一郎、奈良部 雄、表 雅之、林 優子

アサヒビール（株）総合評価センター

研究要旨

液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いたビール中のビスフェノールA分析法を開発した。本法により各種製品ビールについてビスフェノールAの含有量を調査した結果、主要市販缶ビールからビスフェノールAは検出されなかった。また、国内で流通するビール用アルミ缶について一定条件（120℃、30分間）で溶出試験を行い、使用された缶内面塗料とビスフェノールA溶出量に関して調査した。その結果ビスフェノールA溶出量は、缶内面塗料に残留するビスフェノールA量に依存する傾向があることが明らかとなった。

A. 研究目的

ビール用アルミ缶の内面塗装には、エポキシ樹脂塗料が使用されており、ビスフェノールA(BPA)が中身ビールに移行する可能性が指摘されている。本研究では液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いて、信頼性の高いBPA分析法を開発することを目的とした。さらに、この方法を用いて全国各地でサンプリングした、市販缶ビールについて試験を実施しBPA含有量を調べた。また、主要な製缶メーカー4社の製造したビール用缶体について、一定条件（120℃、30分間）で溶出試験を行い、BPA溶出量と使用された缶内面塗料の関係について調査した。

B. 研究方法

B.1 試薬・試料

抽出及び液体クロマトグラフィー(HPLC)の移動相調製等のため、酢酸エチル、ヘキサン、メタノール、エタノール、無水硫酸ナトリウム(各残留農薬試験用試薬；関東化学製)、アセトニトリル(HPLC用試薬；関東化学製)、塩酸(特級試薬；関東化学製)を用いた。また、精製水(蒸留水；Milli-Q、HPLC用；関東化学、住友精密工業製)を使用した。

標準品としてBPA及びBPA-d₁₆(環境分析用試薬；関東化学製)を使用し、各々をエタノールに溶解して10 µg/mLの標準溶液を調製し、適宜希釈して試験に用いた。

市販缶ビール試料として、平成13年1月上旬に全国9都市(札幌、仙台、新潟、東京、

名古屋、大阪、広島、高松、博多)の酒販店にて国内主要4社の350 mL缶ビールをサンプリングした。また、同時期に東京都並びに茨城県内にて同様に主要4社の500 mL缶、1 L缶、3 L樽ビール等をサンプリングして試験に供した。

缶体及び缶蓋は、A社、B社、C社、D社の4社から、弊社に納入されたビール用のアルミ製350 mL缶体及び缶蓋または同試作品を用いた。

缶内面塗料は、イ社及びロ社で製造され、上記の各缶メーカーで使用したエポキシアクリル系水性塗料を供与頂き分析に供した。

B.2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ装置として、Hewlett-Packard社製HP-1100型セパレーションモジュールを使用した。分離カラムには、関東化学製Mightysil ODS 150 mm×2.1 mm I.D.(5 μm)及びGLサイエンス社製Inertsil ODS 150 mm×2.1 mm I.D.(5 μm)のいずれかを使用した。

質量分析計(MS)として、Micromass社製Quattro-Ultima型タンデム質量分析計(MS/MS)を使用した。データ解析には、同社製解析ソフトウェアMassLynxを使用した。

固相抽出(SPE)カートリッジは、GLサイエンス社製GL-Pak PLS-2を予めメタノール及び蒸留水でコンディショニングして使用した。また、固相抽出操作には、GLサイエンス社製SPE用マニホールドを用いた。なお、各試験で使用するガラス器具は、予め有機溶媒で洗浄して使用した。

B.3 測定条件

HPLCはカラム温度を30℃とし、移動相

にはアセトニトリル/水混液(30:70)を0.2 mL/分で送液し、15分でアセトニトリル含量が80%になる様、グラジエント溶出を行った。

MS/MSはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法ネガティブモードで動作させ、コーン電圧60 V、衝突エネルギー20 eV、イオン源温度120℃、Desolvation温度300℃とした。測定モードは、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)で行い、測定質量数はm/z 227→212(BPA)とした。また、BPA-d₁₆についてはコーン電圧60 V、衝突エネルギー20 eVで測定し、測定質量数はm/z 241→223(BPA-d₁₆)とした。

B.4 缶ビールの試験

試料ビールをガス抜きし、その50 mLを量りとり、内標準溶液(BPA-d₁₆, 5 μg/mL)50 μLを加え良く混合した後、固相抽出カートリッジ(GL-Pak PLS-2)に負荷した。水10 mLで洗浄した後、吸引によりカートリッジを乾固した。次に酢酸エチル5 mLで溶離し、これを無水硫酸ナトリウムで脱水した。この液をエバポレータで濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固した。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)を加えて内容物を溶解し2 mLにした。この液をフィルターでろ過し試料溶液とした。

この試料溶液5~20 μLをLC/MS/MS装置に注入して測定を行い、得られたMRMクロマトグラムのBPA(m/z=212)及びBPA-d₁₆(内標準, m/z=223)のピーク面積から、内標準法または標準添加法により、予め作成した検量線を用いて定量を行った。

B.5 缶内面塗料のBPA含量測定

缶内面塗料1 mLを量りとり、内標準溶液

(BPA-d₁₆, 5 μg/mL) 100 μLを加え、0.1 N 塩酸少量で酸性にした。これにヘキサン 5 mLを加えて、約 15 分間振とう抽出した。次にヘキサン層を分離し、その後さらに同様の抽出操作を 2 回繰り返し行った。これらのヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、エバポレータにより濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固した。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)を加え、内容物を溶解し 2 mLにした。この液をフィルターでろ過し試料溶液とした。以降 B.4 と同様に処理し測定を行った。

B.6 缶体の溶出試験

試料缶体を蒸留水で洗浄した後、5%アルコール溶液約 350 mLを入れて、缶蓋を付け巻き閉めを行った。これをオートクレーブに入れて、120℃(または 100, 80, 60, 40℃の各温度)で 30 分間加温した。その後、直ちに水道水で冷却し、開缶して内容液を取り出した。

この液 50 mL を量りとり、内標準溶液(BPA-d₁₆, 5 μg/mL) 50 μL を加え良く混合した後、固相抽出カラム(GL-Pak PLS-2)に負荷した。その後、吸引によりカラムを乾固した。次に酢酸エチル 5 mL で溶離し、これを無水硫酸ナトリウムで脱水した。この液をエバポレータにより濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固した。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)を加えて内容物を溶解し 2 mLにした。この液をフィルターでろ過し試料溶液とした。以降上記 B.4 及び B.5 と同様に処理し測定を行った。

C. 研究結果及び考察

C.1 LC/MS/MS 測定条件の検討

C.1.1 MRM 測定条件及び移動相の検討

BPA 標準試料及び夾雑成分の最も多いと考えられるビール試料等を用いて、MRM 測定条件、移動相組成及びグラジエント条件に関して検討した。

始めに MRM 測定条件に関して、BPA 及び BPA-d₁₆ 標準試料を LC/MS/MS に直接導入し、コーン電圧、衝突エネルギーの最適化及び MRM イオンの選択を行った。その結果、BPA の測定には m/z 227→212 のイオンが最も感度良く測定が可能であり、この場合のコーン電圧及び衝突エネルギーはそれぞれ、60 V、20 eV であった。また、BPA-d₁₆ では、同様にコーン電圧 60 V、衝突エネルギー 20 eV で測定し、測定質量数は m/z 241→223 とした。なお、Fig.1 及び Fig.2 には BPA と BPA-d₁₆ のプロダクトイオンを示した。

次に MS/MS 部を上記条件として、ビール試料を用いて移動相組成に関して検討した結果、アセトニトリル含量が 10~40%の範囲であれば、BPA は他成分と良好に分離することが明らかとなった。そこで、HPLC カラムに強く保持し、測定妨害となる成分等を溶出する目的で、アセトニトリル含量 30%→80%(15 分間)とするグラジエント溶離とした。また、溶出試験試料並びに塗料試料では、BPA の妨害となる成分が認められないことから、本条件をそのまま適用して分析を行うこととした。

C.1.2 分析法のバリデーション

本条件により、ビール、溶出試験液、塗料液を試料とした各場合の分析法のバリデーションを行った。

ビール及び溶出試験液を試料とした場合、本法により BPA を感度並びに精度良く測定

することが可能であることが明らかとなった。本法のビール試料における BPA の定量限界は 0.3 ppb であり、繰り返し精度は変動係数で(cv)で 5%以内であった。

また、溶出試験では液中の BPA 濃度により、試験液を直接 LC/MS/MS 分析に供しても測定が可能であった。この様に本法は TMS 化-GC/MS[sim]法と比べて感度及び選択性が向上しているため、前処理を簡便化することが可能である。これにより処理中のコンタミネーションに対する配慮を簡略化出来る上、分析値の信頼性がさらに向上すると考えられる。

塗料の分析では、繰り返し精度は良好であったが、添加回収率が高値(約 140%)となった。これは前処理法を様々に変更しても改善が不可能であった。しかし、各塗料間の相対比較を行うことは可能であると考え、本法を用いて塗料中の BPA 含量を測定することとした。

C.2 市販缶製品ビールの試験結果

現在国内で流通している主要メーカーの缶ビールには、製缶メーカー7社で製造された缶体を使用されている。各製缶メーカーは各々複数の工場を有しているため、同一メーカーの缶体であっても製造法は異なることが考えられる。そこで、これらを網羅出来る様、全国から市販缶ビールをサンプリングし試験した。

即ち、全国 9 都市でサンプリングした主要 4 社製缶ビール(350 mL 缶)計 36 試料及び東京都、茨城県内でサンプリングした缶ビール(500 mL 缶等)10 試料を試験に供した。

その結果、試験した全ての試料缶ビールから、BPA は検出されなかった(table 1)。

現在国内で生産される主要缶ビールに使用される缶体は、缶内面塗料及びその塗布、焼き付け方法等について検討が行われ、BPA の溶出を無くすための対策が講じられている。今回の試験結果から、市販主要 4 社製缶ビールでは、BPA 溶出の懸念はないことが明らかとなった。

C.3 缶内面塗料の BPA 量調査結果

缶内面塗装からの BPA の溶出は、塗料中に残留する未反応の原料モノマーが原因と考えられている。そこで、弊社で入手出来た数種の缶内面コーティング用エポキシシアクリル系水性塗料に関して、塗料中の BPA 含量を調査した。また、同一塗料メーカーで BPA 低減化のため、処方変更を行った前後での BPA 含量を比較した。

塗料から BPA を抽出する方法に関して液々抽出法を検討した。始めに抽出溶媒を選択する為、様々な有機溶媒を比較検討した。その結果、各塗料は多くの有機溶媒で塗料成分と抽出溶媒層が十分に分離しなかった。これに対しヘキサンでは、塗料成分とヘキサン層が分離し抽出操作上問題はなかった。そこで、ヘキサンをを用いて回収試験を行った所、塩酸酸性下では再現性良く抽出されたが、回収率が約 140%となり定量性には問題が残った。この点を改善するため、更に検討を行ったが、満足な回収率を得る方法は見出せなかった。

これより本法では、BPA 含量を概算し相対的な含量比較を行うことは可能であると考え、各塗料の分析を行った。その結果、各塗料試料から BPA を検出し、その量は約 0.1~0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であった。Table 2 に試験結果を示した。また、Fig.3 にクロマト

グラムの一例を示した。

新旧処方 of 塗料で BPA 含量を比較すると、イ社品では旧処方が約 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるのに対し、新処方では約 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と低減した。一方、ロ社品では旧処方が約 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、新処方が約 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった。この様に、今回の試験から処方変更により、BPA 量が 1/2~1/4 程度に低減することが確認された。

C.4 缶体の溶出試験結果

ビール用アルミ缶の内面塗装は、防食・内容物の風味保持等の目的で施されており、その基本性能に関する試験方法は既に確立されている。しかし、塗膜に含まれる微量の BPA 量を測定し、内面塗装を評価する試験方法はない。そこで、ここでは缶体にビールを模した一定組成(5 %エタノール溶液)の試験液を封入し、40~120°C の温度下に一定時間保持した後、BPA 溶出量を測定し評価を試みた。

その結果、特に温度条件に依存して液中に溶出する BPA 量は異なり、80°C 未満の温度では溶出は認められないが、これ以上の温度条件下では微量の溶出が認められることが明らかとなった。

そこで、加熱条件を溶出が認められる 120°C、30 分間に定め、弊社に納入された缶ビール用アルミ缶に関する溶出試験を実施した。その結果、新処方の塗料により製造した 4 製品の BPA 溶出量は、0.3~0.5 μg 程度であった。また新旧処方の塗料使用品で比較した場合、A 社及び B 社の 2 社製品で、ともに新処方塗料を使用した場合、BPA 溶出量が低下することが明らかとなった。これらの試験結果を Table 3 に示した。

一方、上記の各缶体は製造設備上の制約から、同様の塗料塗布法並びに焼付け処理により製造されている。従って、新旧処方缶内面塗料使用缶体で見出された BPA の溶出量の差異は、主として塗料中の BPA 含量差に由来すると考察される。従って、缶体製造時に BPA 含量の少ない高品質の内面塗料を用いることで、BPA の溶出を低減化出来ることが示唆された。

また、これらの溶出量は使用した塗料中の BPA 含量概算値及び塗料使用量から算出した塗膜中の BPA 残存量より高値であった。これより、塗料塗布後に行う焼付け等の処理で、塗膜の BPA 量が増加する可能性があることが明らかとなった。

なお、缶ビールは炭酸ガスを含有するため、高温下で保存する事は事実上不可能である。従って、BPA の溶出が市販の缶ビールで起こることは考えられないことを付記する。

D. 結論

ビール中の BPA を簡便かつ高精度に測定する LC/MS/MS 法を開発した。本法は、感度並びに選択性が高く、従来法より簡便な前処理で分析を行うことが可能となり、信頼性の高い試験結果が得られる。

本法により各種缶ビールについて BPA の含有量を調査した結果、主要市販缶ビールから BPA は検出されなかった。缶ビールは製造工程及び流通過程で高温下に晒されることはない。また、仮に製品の温度が上昇した場合、缶内のガス圧により栓が開き漏洩が起こる。従って市販主要缶ビールでは、BPA が検出されることはないものと推定される。

次に、ビール用アルミ缶体に関して一定条件で溶出試験を実施して、使用された缶内面塗料の品質とBPA溶出量に関して調査した。その結果、BPAの溶出は80℃以上の高温条件下で認められ、溶出量は缶内面塗料のBPA量に依存する傾向があることが明らかとなった。これより、缶体製造時にBPAを低減化した高品質の内面塗料を用いれば、BPA溶出の可能性は、事実上殆ど無くなることが示唆された。

E. 研究発表

論文投稿予定

F. 知的所有権の所得状況

なし

G. 参考文献

- 1) 河村 葉子：「缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出に関する研究」平成11年度厚生科学研究費補助金研究成果報告書

Table1 缶ビールの試験結果

サンプリング地	製造メーカー	銘柄	容量	缶製造メーカー	BPA 検出量 ($\mu\text{g/L}$)
札幌	1	a	350 mL	C	ND
	2	b	"	E	ND
	3	c	"	C	ND
	4	d	"	C	ND
仙台	1	a	350 mL	A	ND
	2	b	"	C	ND
	3	c	"	C	ND
	4	d	"	C	ND
新潟	1	a	350 mL	A	ND
	2	b	"	C	ND
	3	c	"	C	ND
	4	d	"	C	ND
東京 茨城	1	a	350 mL	B	ND
	2	b	"	E	ND
	3	c	"	E	ND
	4	d	"	C	ND
	1	a	500 mL	B	ND
	2	b	"	F	ND
	3	c	"	E	ND
	4	e	"	F	ND
	1	a	1 L	G	ND
	2	b	"	F	ND
	3	c	"	C	ND
	4	e	"	C	ND
	1	a	3 L	H	ND
	2	b	"	-	ND
名古屋	1	a	350 mL	B	ND
	2	b	"	E	ND
	3	c	"	B	ND
	4	d	"	C	ND
大阪	1	a	350 mL	C	ND
	2	b	"	F	ND
	3	c	"	C	ND
	4	d	"	C	ND
高松	1	a	350 mL	C	ND
	2	b	"	E	ND
	3	c	"	C	ND
	4	d	"	C	ND
広島	1	a	350 mL	B	ND
	2	b	"	C	ND
	3	c	"	B	ND
	4	d	"	C	ND
博多	1	a	350 mL	C	ND
	2	b	"	E	ND
	3	c	"	B	ND
	4	d	"	C	ND

※ ND < 0.3 $\mu\text{g/L}$