

Table 2 缶内面塗料の試験結果

塗料	製造メーカー	処方	BPA量($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A-1	イ社	旧	0.42
A-2	"	新	0.12
B-1	ロ社	旧	0.89
B-2	"	新	0.48

Table 3 缶体の120°Cにおける溶出試験結果

缶体	製造メーカー	塗料処方	BPA溶出量(μg)
A-a	A	旧	0.39
A-b	A	新	0.35
B-a	B	旧	1.37
B-b	B	新	0.46
C-b	C	新	0.32
D-b	D	新	0.49

Fig.1 BPAのプロダクトイオン

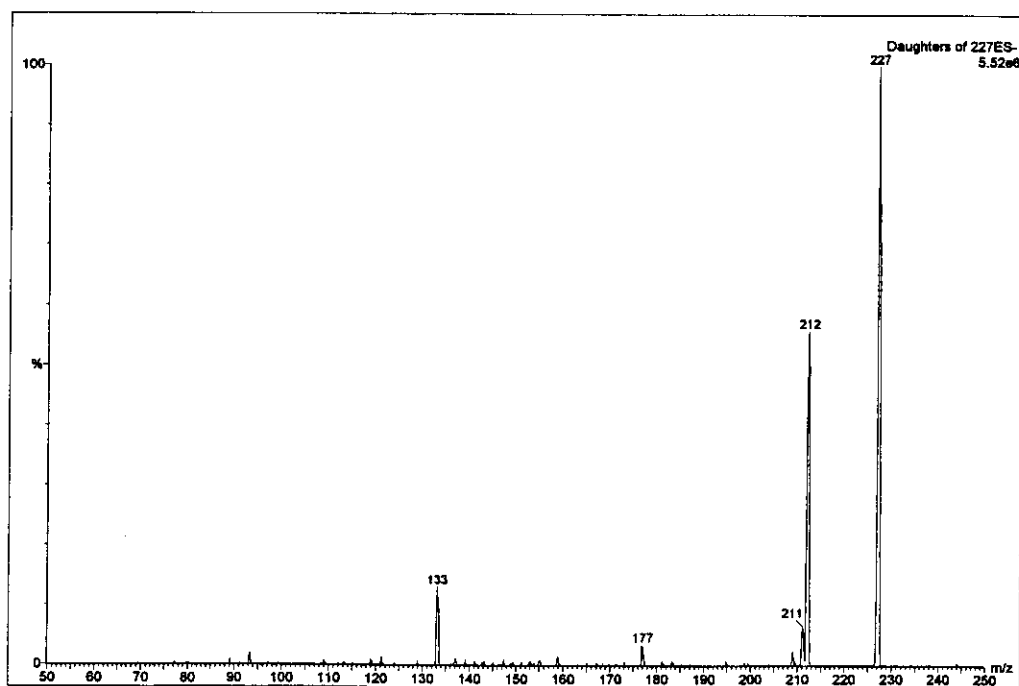


Fig.2 BPA-d₁₆ のフラグメント

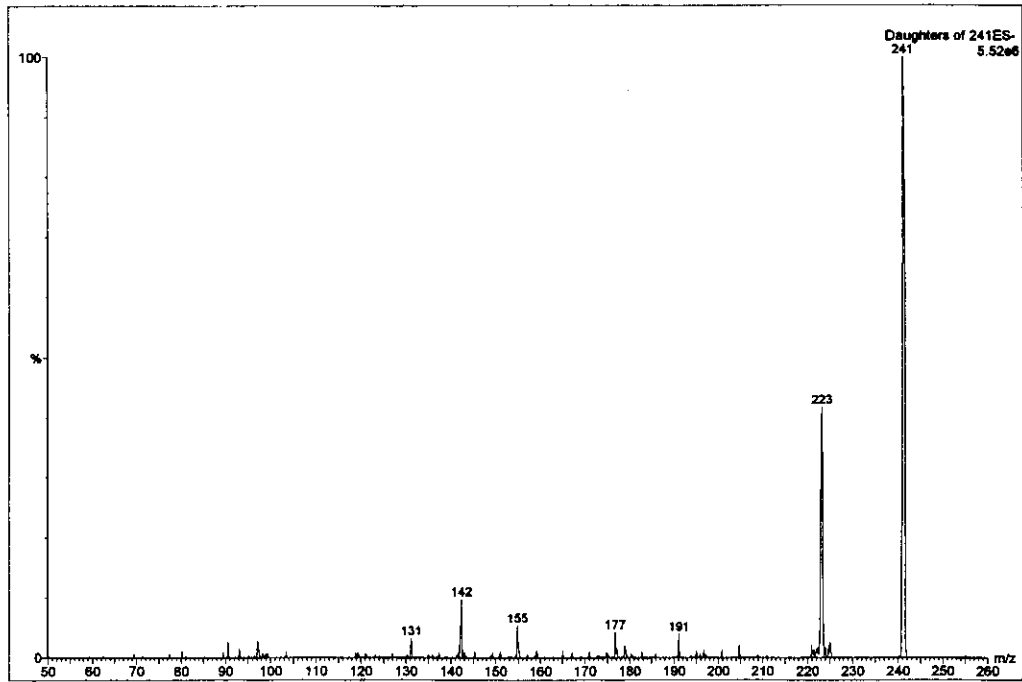
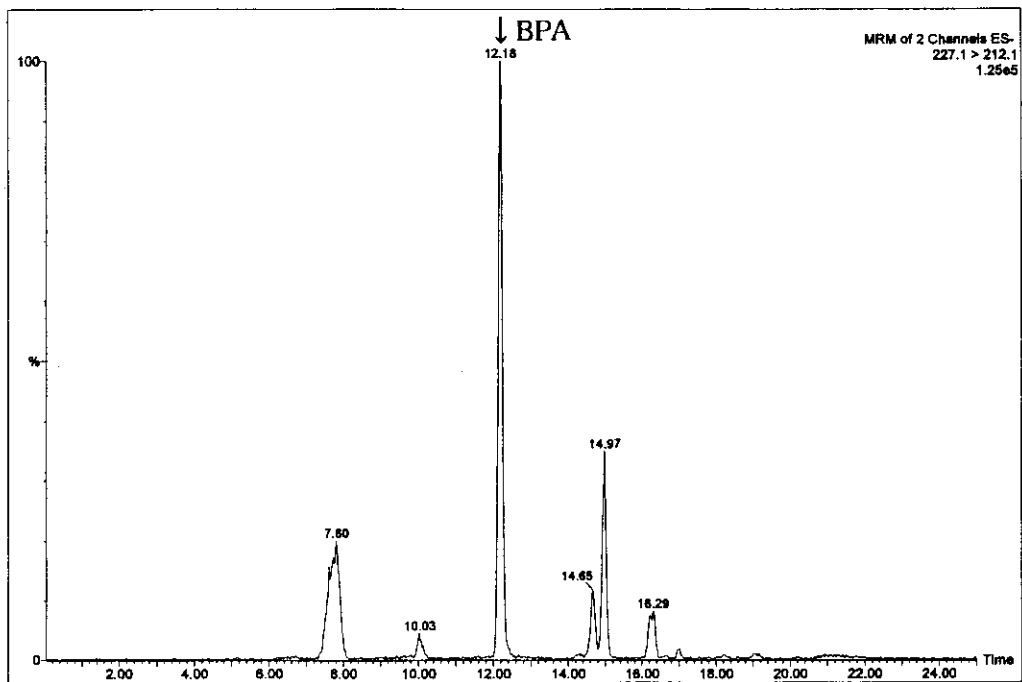


Fig.3 塗料試料液のMRMクロマトグラム



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 $\cdot\text{2H}_2\text{O}$ 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 $\cdot\text{2HCl}$ 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-diphenol (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 \rightarrow 17min, A/B=45/55
 \rightarrow 25min, A/B=40/60 \rightarrow 26min, A/B=0/100

流速：1.0mL/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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 $^{\circ}$ C (3min) - 10 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C (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 $^{\circ}$ C

インターフェース温度：280 $^{\circ}$ C

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

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

生ず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 $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ となる。この $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ 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. $\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ の濃度

$\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}$ を同時に検出した。

$\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ を検出したものはそれほど多くなかったが、 $\text{BADGE} \cdot \text{HCl}$ 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 $\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ の多くは、エポキシ樹脂合成時の不純物である $\text{BADGE} \cdot \text{HCl}$ が溶出後、加水分解を起こして $\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ になったものと考えられた。

$\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ 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、主としてブルトップ型の缶詰 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 μ g/缶), BADGE の加水分解体である BADGE \cdot 2H₂O 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 μ g/缶)。また、BADGE の塩化水素付加体である BADGE \cdot 2HCl が 7 検体 (0.7 ~ 4.8 μ g/缶) から、BADGE \cdot H₂O \cdot HCl が 21 検体 (0.6 ~ 22.0 μ g/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.

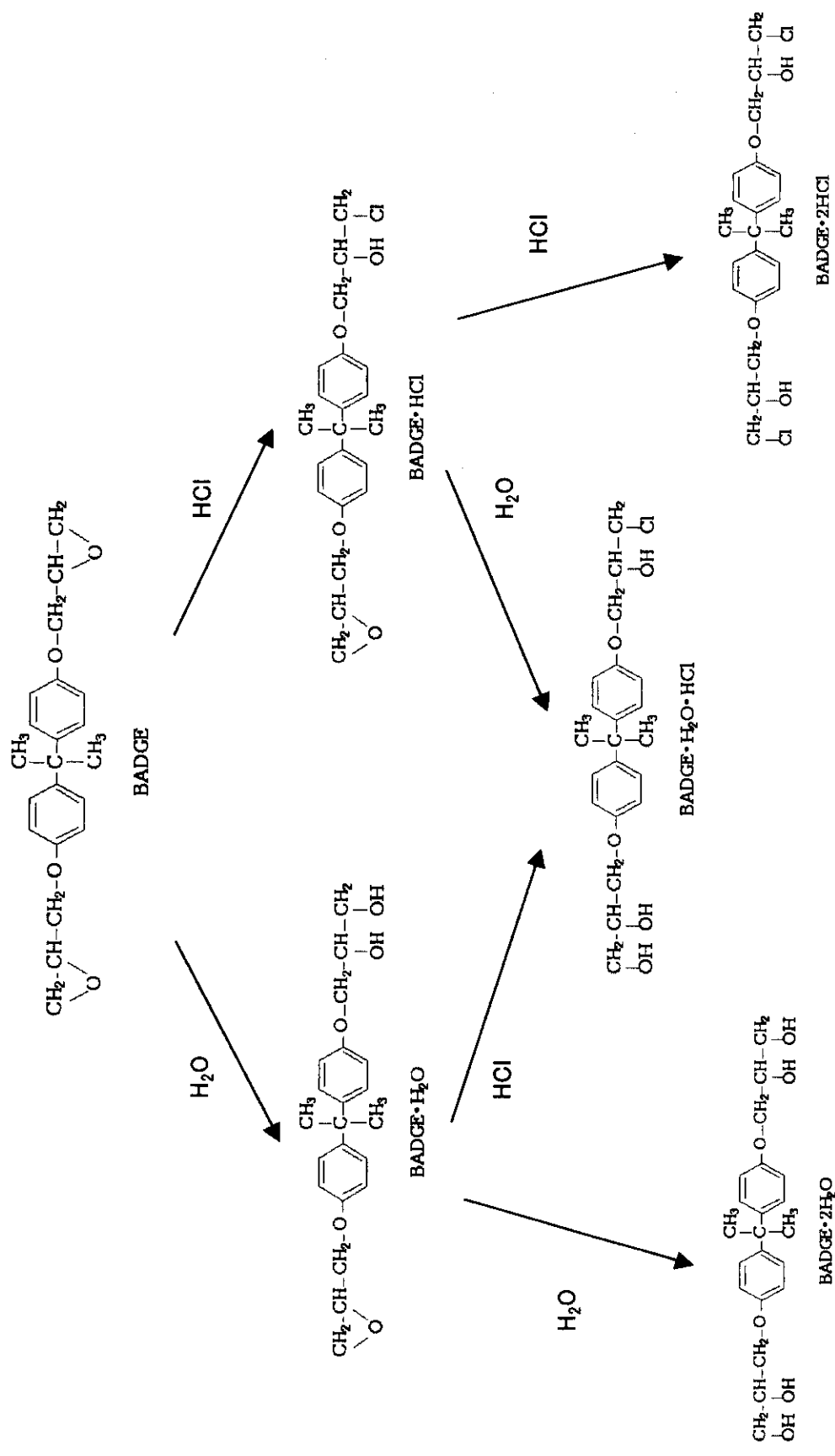


図1. BADGEの加水分解体および塩化水素付加体

表1. 添加回収実験結果

試料	試料数	平均回収率%									
		2H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O·HCl	BPA	BADGE	HCl	2HCl			
1% 食塩水 10mL	5	88.2	87.8	91.7	94.4	87.3	89.9	89.4			
10% ショ糖溶液	3	85.1	93.3	93.6	94.0	88.2	91.1	91.2			
魚肉(茹でた鮭肉)10g + サラダ油 1g	3	87.1	93.3	95.2	92.1	88.4	94.7	90.4			
どうもろこし(茹でたもの) 10g	3	84.2	92.6	92.2	95.3	86.4	89.7	89.6			
サラダ油 2.5g	5	92.6	95.1	96.0	93.3	86.3	88.2	90.6			

HPLC-蛍光検出器を用いて算出した。

上記試料に対し、各物質0.25～0.60 μ g添加した。

斜字:標準偏差(SD)は6.7, それ以外の標準偏差は5.0以下であった。

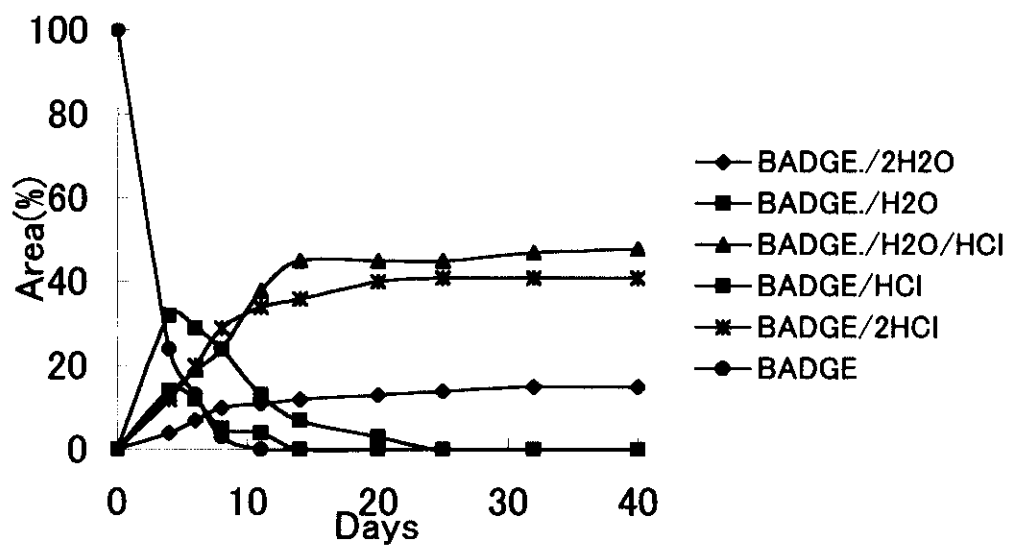


図2. 1%塩化ナトリウム溶液によるBADGE関連物質の生成とその経時変化 (HPLC-蛍光検出器による測定)

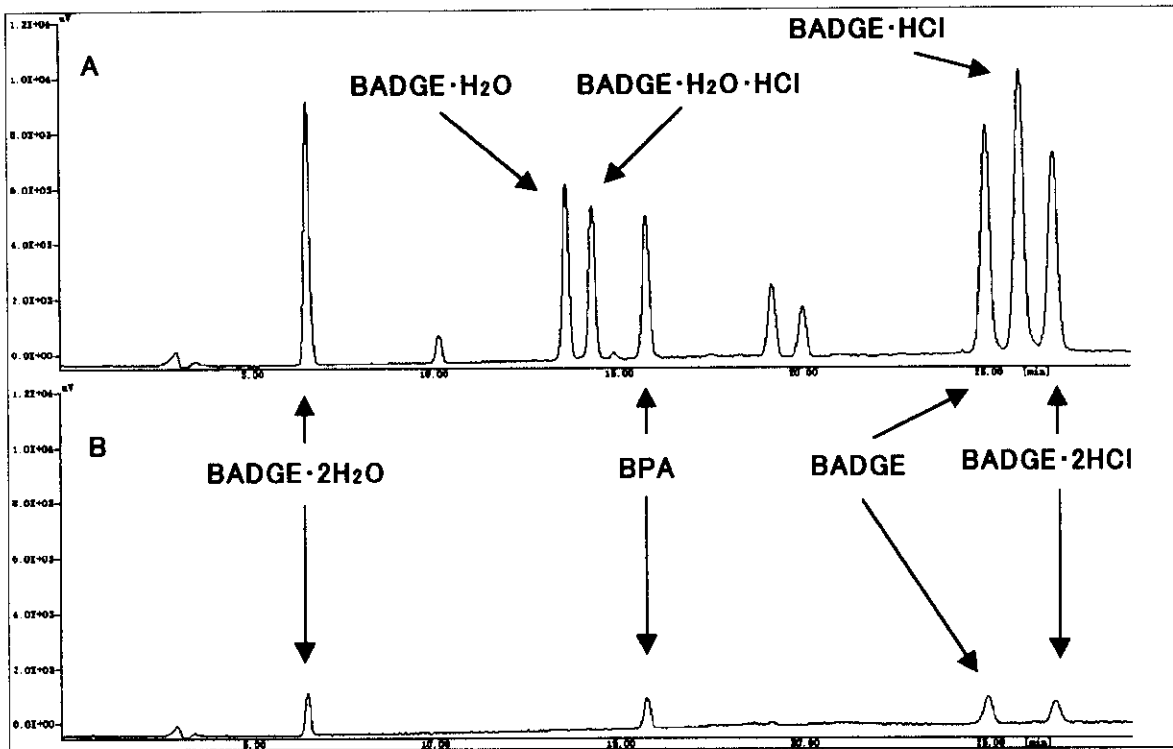


図3. 標準溶液のクロマトグラム

A: BADGEを1%塩化ナトリウム溶液処理したものに, BPA標準溶液を加えた混合溶液.
 B: 市販されている標準溶液(各0.05ppm).

HPLC条件

カラム: Discovery RP-amide C16 (4.6mm × 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°C
 注入量: 10 μL
 検出器: 蛍光検出器 (Ex/Em=275nm/300nm)

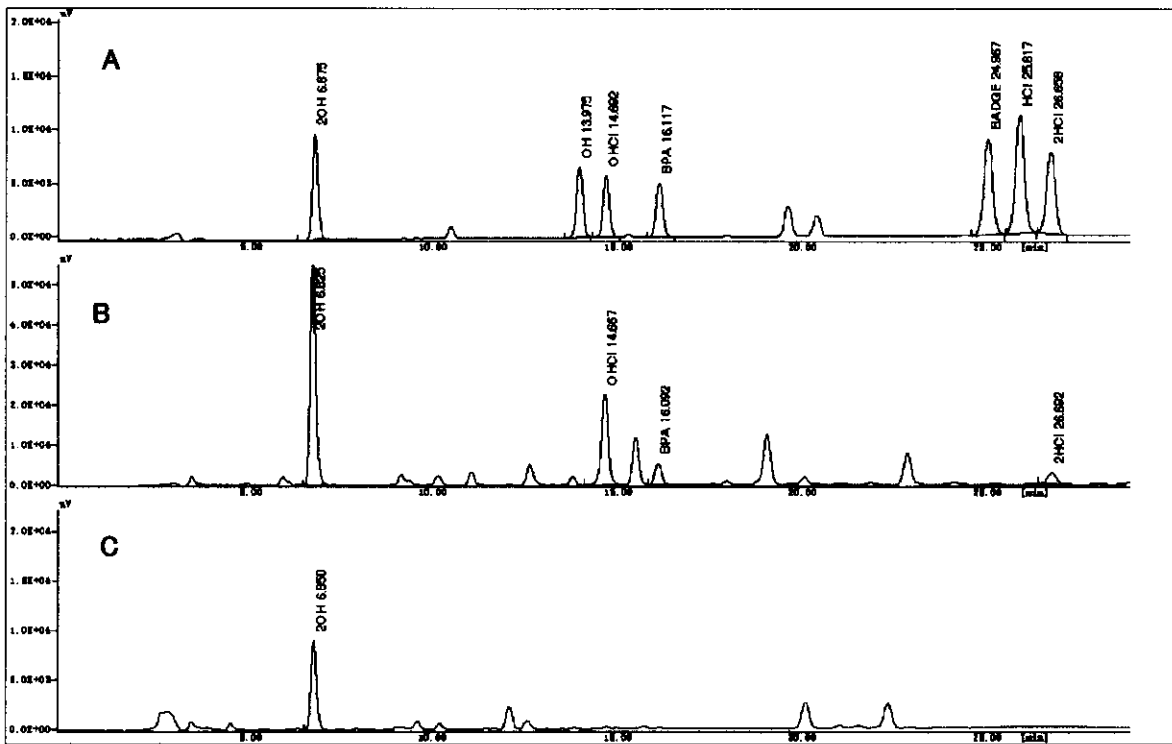


図4. 主なサンプルのクロマトグラム

A: BADGEを1%塩化ナトリウム溶液処理したものに、BPA標準溶液を加えた混合溶液.

B: マッシュルーム缶詰-固形分(5g相当).

C: ツナ缶詰-固形分(5g相当).

* 2OH: BADGE·2H₂O OHCl: BADGE·H₂O·HCl OH: BADGE·H₂O
 HCl: BADGE·HCl 2HCl: BADGE·2HCl

HPLC条件: 図3と同じ

表2. HPLC-蛍光検出器法とアセチル化GC-MS法によるBPAの定量

試料	BPAの定量値 (ng/g)	
	HPLC-FL	GC-MS (m/z 312(213))
マッシュルーム(固形分)	46.4	49.2 (47.3)
かに(固形分)	94.7	102.7 (102.6)
ツナ(固形分)	10.4	11.5 (11.1)
ツナ(油分)	20.3	22.5 (21.4)

*GC-MS法の定量値ではd体による補正はしていない。

表3. カートリッジ選択および定量値の誤差

試料(選択カートリッジ)	定量値 (ng/g)			
	BPA	BADGE	HCl	2HCl
コーン固形分(フロリジル)	43.0	33.8	15.2	87.3
コーン固形分(OASIS HLB)	47.7	31.2	14.4	89.2
グリーンピース固形分(フロリジル)	50.8	ND	ND	26.2
グリーンピース固形分(OASIS HLB)	50.4	ND	ND	28.1

*HPLC-蛍光検出器による測定
ND < 10ng/g

表4. 缶詰食品中のBPAおよびBADGE関連物質の量

種類(検体数)	BPAおよびBADGE関連物質の量($\mu\text{g}/\text{缶}$) [未検出缶詰数]			
	BADGE \cdot 2H ₂ O	BADGE \cdot H ₂ O \cdot HCl	BPA	BADGE \cdot 2HCl
野菜缶(17)	1.5~27.4 [0]	1.7~22.0 [4]	2.1~12.5 [4]	0.7~4.8 [10]
果実缶(2)	19.2~24.5 [0]	- [2]	- [2]	- [2]
魚介水煮缶(4)	5.3~25.4 [0]	0.6~2.1 [0]	0.7~12.8 [0]	- [4]
魚介油漬缶(7)	1.0~11.8 [0]	0.7~3.6 [3]	0.3~1.6 [2]	- [7]

*HPLC-蛍光検出器を用いて分析した。

量は、缶詰の種類により、固形分および液相もしくは油相分中の量の総和を示した。
BADGE \cdot H₂O、BADGEおよびBADGE \cdot HClについては検出されなかったので省いた。

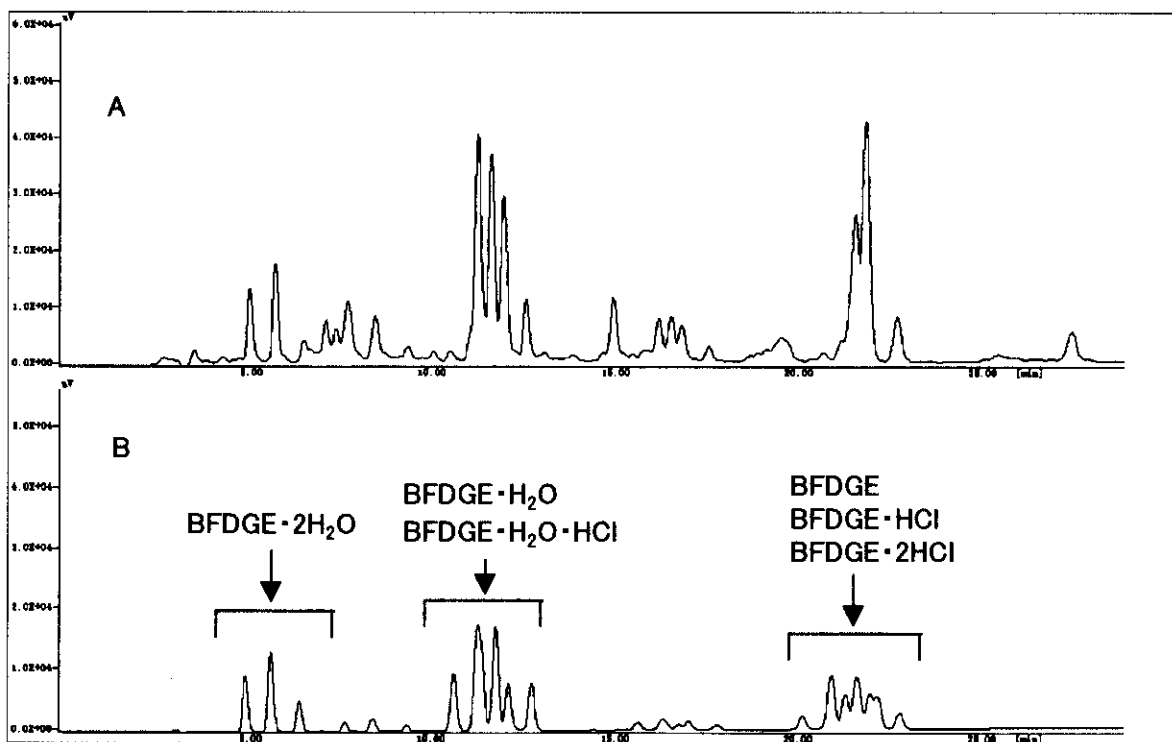


図5. HPLCクロマトグラム

A: ホタテ水煮缶詰-固形分(5g相当)

B: BFDGEの1%塩化ナトリウム処理溶液

HPLC条件: 図3と同じ

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および動態解析
容器包装素材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学

分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所

研究要旨

血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析：輸血用血液バッグから溶出するテトラヒドロフランおよび 2-エチル-1-ヘキサノールの溶出挙動を明らかにするとともに、実際の医療に用いられる輸血用血液に含まれる揮発性有機化合物の実態について調査を行った。さらに、人工透析用の透析膜およびそれに付随して使われる血液回路から溶出する物質の予備調査を実施した。

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 ジグリシジルエーテル関連物質の分析：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蛍光検出高速液体クロマトグラフィーを用いて検討するとともに、缶詰食品について BPA および BADGE 関連物質の分析を行った。

医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析：内分泌かく乱化学物質として疑いのある Cd、Pb 等 21 種類の金属が医療用具及び食品の容器包装材料等の高分子素材中に含有されているか否かについて検討した。

研究協力者

血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析：猪飼誉友、近藤文雄、伊藤裕子、岡 尚男、松本 浩（愛知県衛生研究所）

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：小林 進、堀江正一、吉田栄充（埼玉県衛生研究所）

医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析：益川邦彦、藤巻照久、平山クニ（神奈川県衛生研究所）

A. 研究目的

血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析：前年度の研究成果として、輸血用血液バッグからトルエン、キシレン、スチレンモノマーなどの芳香族系有機溶剤の他に、テトラヒドロフランや 2-エチル-1-ヘキサノール等も大量に溶出することを報告した。今回、これら芳香族系以外の溶剤の溶出挙動等について調査を行なうとともに、赤十字血液センターで血液バッグに保存されていた濃厚赤血球液を用いて、

トルエン等溶出が疑われる揮発性有機化合物の調査を実施した。さらに、血液バッグよりも血液の接触面積が大きいこと、上述のような化合物の溶出が懸念される人工透析用の透析膜ユニットおよびそれに付随して使われる血液回路について、溶出物質の予備調査を実施した。

缶詰食品中のビスフェノール A (BPA) およびビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE) 関連物質の分析：前年度、BPA の缶詰食品へ移行を明らかにしたが、BPA 同様エポキシ樹脂のモノマーであり、また BPA の骨格を有するビスフェノール A ジグリシジルエーテル (以下 BADGE) 関連物質についても缶詰食品中に移行している可能性がある。しかし、缶詰食品中の BADGE 関連物質についての情報はきわめて少ないことから、BPA および BADGE 関連物質のヒトに対する暴露量を把握するために、本年度は蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC/FL) を用いた一斉分析法を検討し、さらに開発した分析法を用いて缶詰食品への移行量を調査した。

医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析：内分泌かく乱化学物質として疑いのある Cd、Pb 等 21 種類の金属が、医療用具及び食品の容器包装材料等に用いられている高分子素材中に含有されているか否かについて検討した。

B. 研究方法

B-1. 血液バッグ保存血液中の内内分泌かく乱化学物質の分析

血液バッグおよび濃厚赤血球液：と畜場においてと殺された豚の血液約 10L をステンレス製バケツにて採取し、抗凝固剤を加えることなく十分攪拌して均一化した後、異なる製造会社 3

社の血液バッグ各 10 個に約 200 g 詰め、6℃の冷蔵庫中に保存した。保存当日および 1、2、4、8、12、16、20 日後にバッグを開封して血液を取りだし、遠心分離により調製した血清を試料として凍結保存した。ヒト濃厚赤血球液としては、日本赤十字社愛知支部で製造され、期限切れとなり、廃棄処理となっていた 4 バッグを使用した。解凍した豚血清あるいはヒト濃厚赤血球液 0.1~1.0mL を、飽和食塩水 14mL および内部標準液が入っているヘッドスペースバイアルに加えて密封した後、ヘッドスペース-GC/MS 法により揮発性有機化合物の分離・定量を行った。

透析膜：特定一医療機関の透析膜洗浄現場にて洗浄液を 130mL ごとに 15mL 採取し、上述と同様に分析を行なった。

B-2. 缶詰食品中の BPA および BADGE 関連物質の分析

市販缶詰 30 検体 (果実缶 2、野菜缶 17、魚介缶 11) について、分析を行った。缶詰食品は、固形分、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。

固形試料 10g (湿重量) をアセトニトリル 50mL で 2 回抽出後、ヘキサン 50mL と振とうし、アセトニトリル相を分取した。アセトニトリル相を乾固後、残留物をメタノール 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。溶出液を減圧濃縮後、メタノールに溶解し、HPLC/FL により分析した。

液状試料 10mL に適宜精製水を加え混和し、OASIS HLB カートリッジに負荷した後、以下、固形試料と同様に操作した。

油試料 0.5gをヘキサン 30mL で希釈し、各 60mL のアセトニトリルで2回抽出した後、アセトニトリル相を分取した。アセトニトリル相を乾固後、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。以下、固形試料と同様に操作した。

B-3. 医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析

以下に示す 53 検体を分析した：手術用縫合糸 10 検体、ドレーンチューブ・カテーテル類 6 検体、静脈留置針 5 検体、エクステンションチューブ、輸液セット類 7 検体、デスポーザブル注射筒 2 検体、医療用手及び家庭用手袋 10 検体、食品包装用ラップフィルム 7 検体、電子レンジ加熱料理用シート 4 検体、弁当箱、ポリ塩化ビニル製袋各 1 検体。

細切した試料 0.5g を磁製のつぼに入れ、硫酸 3mL 加え、100～150℃で大部分の硫酸分を蒸発させた後、直火上で乾固した。さらに電気炉で 500℃、24 時間加熱し、灰化した。この残留物に 1N 硝酸を 5mL 加えた後、加温して溶解させた後、ろ過し、ろ液に水を加えて正確に 50mL とし、試験溶液とした。定量は高周波プラズマ発光分析装置 ICPS-7000 (島津製作所) を用いて行った。分析した項目は、以下のとおりである：Na、Mg、Al、K、Ca、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Ag、Cd、Sn、Ba、Tl、Pb。

C. 結果と考察

C-1. 血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

血液バッグで保存された豚血液中のテトラヒ

ドロフランおよび 2-エチル-1-ヘキサノールの濃度は、保存開始後数日間は上昇し、その後はほぼ一定のレベルを維持する傾向が認められた。しかしながら、これらの化学物質濃度は、製造会社毎に異なり、テトラヒドロフランは 36.3ppm、2-エチル-1-ヘキサノールは 4.5ppm (いずれも特定の 1 社製) がそれぞれの最高値であった。

日本赤十字社で血液バッグ中に保存されていたヒト濃厚赤血球液からは、トルエン、キシレン、スチレンモノマーなどが、測定した 4 試料からほぼ同程度の濃度レベルで検出され、芳香族系有機溶媒類ではトルエンが最も高く、その平均濃度は 4.6ppb であった。ヒト濃厚赤血球液中の化学物質濃度は、昨年度豚血液を用いて行なった溶出挙動調査結果よりも低いものの、我々が予備的に調査した人血液中の濃度 (平均 1.0ppb, n=12) よりも明らかに高かった。従って、バッグの材質に含まれているこれらの化学物質が保存血液中に溶出しているという昨年度の豚血液を用いた実験結論を支持する結果であると考えられる。また、今回この結果と豚血液を用いて行った溶出挙動の調査結果を比較では、テトラヒドロフランはほぼ同程度であったのに対し、2-エチル-1-ヘキサノールは、ヒト濃厚赤血球液の方が平均濃度で 11.3ppm と、豚血液 (平均濃度 3.3ppm) よりも数倍高かった。これは 2-エチル-1-ヘキサノールの脂溶性が高いことから、血液バッグからの溶出は、バッグに保存された試料に含まれる脂質など低極性物質の量に依存すると考えられ、豚全血とヒト濃厚赤血球液の脂質含有量の違いにより濃度の違いが生じるのではないかと推察された。

人工透析用透析膜ユニットについては、5 種類

の異なるユニットを用いて洗浄液中の揮発性有機化合物を分析した。その結果、ジクロロメタン、メチルエチルケトン、テトラヒドロフラン、シクロヘキサンがユニットから洗浄液中へ溶出していることが認められた。また、これらの化学物質の洗浄液中の濃度は、洗浄終了時においても ppm～サブ ppm のレベルにあることが明らかになった。これらの事実は、血液透析ユニットから溶出される化学物質がいずれも低極性物質であるため、生理食塩水を用いて行なわれている通常の洗浄操作では、完全に除去することが困難な結果によるものと考えられた。

C-2. 缶詰食品中の BPA および BADGE 関連物質の分析

前年度、BPA および BADGE と BADGE 塩化水素体の分析には、前処理中に BADGE が加水分解を起こすことを懸念して、前処理法として順相系のクリーンアップ法を採用した。しかし、加水分解体の検出については、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。そこで今年度の研究では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 塩化水素体及び BADGE 加水分解体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た。また、負荷後の洗浄液として 40%メタノール溶液を 10mL 使用した後、溶出液としてメタノール 6mL を使用した。

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。その濃度は、1 缶当たり 0.3～12.8 μg 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。

BADGE 関連物質については、BADGE、BADGE 塩化水素体及び BADGE 加水分解体は検出されなかったが、BADGE 加水分解体については、ビスフェノール F 型塗装缶を除くすべての缶詰から検出された（1 缶当たり、1.0～27.4 μg ）。特に果実缶では、19.2～24.5 $\mu\text{g}/\text{缶}$ と高い値であった。単位グラム（mL）当りの移行量はやや液相に多い傾向があり、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。

BADGE 塩化水素体は 30 検体中 7 検体から検出された（0.7～4.8 $\mu\text{g}/\text{缶}$ ）が、そのすべてが野菜缶詰の固形分からであった。また、検出された 7 検体のうち内面コーティング剤に塩化ビニル樹脂が配合された缶を使用していたものが 4 検体、スリーピース缶が 3 検体であった。

BADGE 塩化水素体・BADGE 加水分解体は 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 1.7～22.0 μg 、魚介缶で 0.6～3.6 μg と、有意に野菜缶で高かった。概ね 80ppb 以上が検出された 7 検体からは、同時に BADGE 塩化水素体が検出された。

C-3. 医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析

「研究方法」の項に示した 53 検体について、21 種類の金属の分析を行なったが、内分泌かく乱化学物質として疑いのある Cd、Pb のうち、Cd はいずれの検体からも検出されなかった。Pb は経皮胆道カテーテル 1 検体からのみ（24.6ppm）