

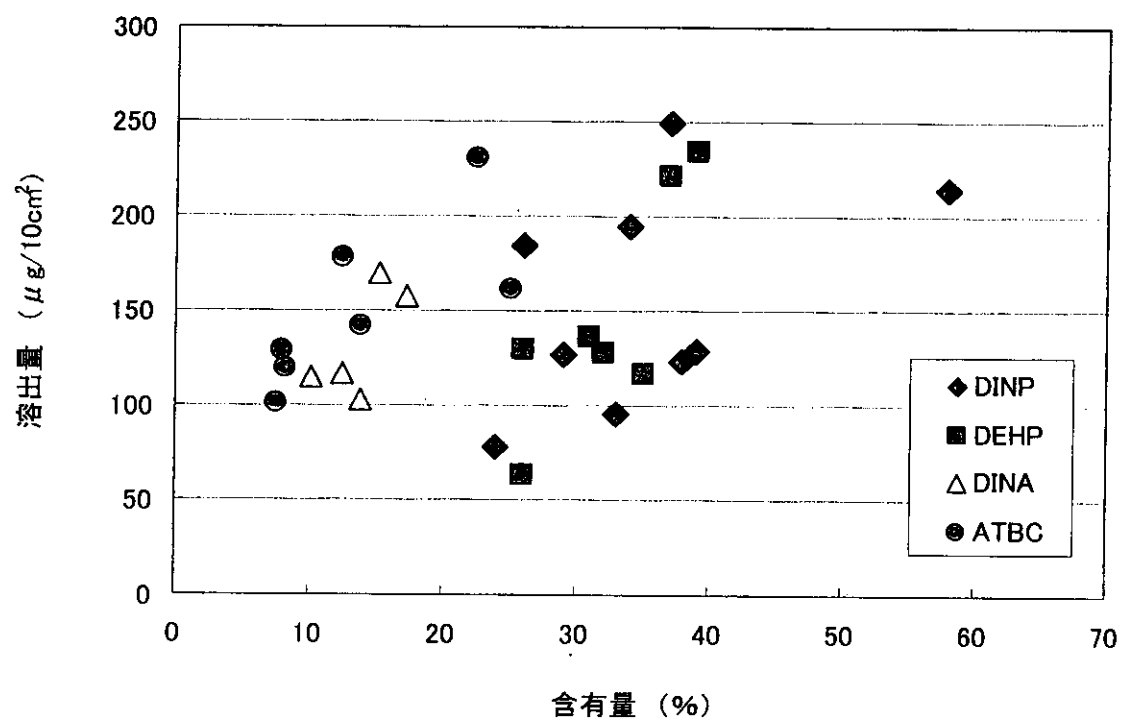


図1. 可塑剤含有量と溶出量の関係

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

協力研究報告書

「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解析」

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学）

高分子樹脂製玩具からの内分泌かく乱化学物質の溶出挙動に関する研究
—フタル酸ジエステルのヒト唾液中でのモノエステル体生成に関する研究—

分担研究者 米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

協力研究者 石橋 亨，新野竜大（財団法人東京顕微鏡院）

研究要旨

本研究は、平成 12 年度の厚生科学研究におけるヒト唾液中のフタル酸ジエステルの脱エステル反応によるモノエステル体生成の結果に基づき、ヒト唾液中での唾液酵素のフタル酸ジエステルの加水分解反応に及ぼす影響について検討した。被験者のチューイングにより分泌されたヒト唾液を -5°C 、3000 rpm で遠心分離し、 $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した上澄みを唾液試料として用いた。加水分解反応の活性の測定は、フタル酸ジエステルを添加した唾液試料を 37°C 、30 分間インキュベーション後、生成したフタル酸モノエステル量を GC/MS および HPLC 分析した。フタル酸ジブチルからのフタル酸モノブチルの生成率は唾液試料濃度および唾液試料中のタンパク質濃度に有意な相関性を示した。この反応の至適温度が 50°C 、および至適 pH が 8.0 に認められた。その唾液試料はフタル酸ジエステルの直鎖のアルキル基、特に炭素数 4 のブチル基に強い基質特異性を示し、側鎖を持つ 2-エチルヘキシル基およびベンジル基にはほとんど活性を示さなかった。唾液試料中でのフタル酸モノエステルの加水分解によるフタル酸の生成は認められなかった。また、唾液試料に冷アセトンを加えることにより分離された粗酵素液にも唾液試料と同等の加水分解活性および基質特異性がそれぞれ認められた。唾液中のフタル酸ジエステルからモノエステルへの加水分解は唾液中のエステラーゼ、特にリパーゼが大きく関与し、またこれらは、モノエステルの脱エステル反応によるフタル酸生成に対するエステラーゼとしては活性を示さないことが明らかとなった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の一つとして疑われているフタル酸ジエステルは合成樹脂の可塑剤として広く使用されている。これら化合物のうち、フタル酸ジイソノニル (DINP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) およびフタル酸ジ-n-ブチル (DBP) は乳幼児用ポリ塩化ビニル (PVC) 製玩具に高濃度で含まれている^{1,2)}。なかでも DBP および DEHP は精巣テストステロン濃度に影響を与え、精巣萎縮への関与が認められている³⁾。また最近、DBP の生体（腸管、脾臓または血液

等）内での主要な代謝物であるフタル酸モノブチル (MBuP) の毒性が、雄胎児ラットの生殖系に高い感受性を示すことを報告している⁴⁾。さらに、DINP および DEHP は高濃度で非変異・ガン原性を示し、動物実験において発ガンプロモーター作用が認められている^{5,6)}。

このような背景から、フタル酸ジエステルの乳幼児用玩具への可塑剤としての使用を制限する対策が世界各国で講じられている。我が国においてもフタル酸ジエステルのうち、DEHP 及び DINP の乳幼児用玩具への使用が規制されて

いる。しかし、合成樹脂製品へのフタル酸ジエステルの使用は広範囲にわたり、現在でも多量に使用されている。

昨年度までの本研究では、成人被験者のチューイングによるポリ塩化ビニル製乳幼児用玩具から口腔内へのフタル酸ジエステルの溶出試験において、ヒト唾液に溶出した一部のフタル酸ジエステルが加水分解し、そのモノエステル体を生成することを明らかにした⁹⁾。このフタル酸モノエステルの生成量は、フタル酸ジエステルのアルキル基の違いにより大きく異なることが認められた。フタル酸ジエステルは、生体内の酵素（腭臓リパーゼ、腸管エステラーゼまたは血液中エステラーゼ等）の加水分解反応によりそのモノエステル体を生成することが報告されている^{9,10)}。また、ヒト唾液中には脱水素酵素、リゾチーム、アミラーゼまたは舌リパーゼ等の唾液タンパクが存在する¹¹⁾。

本年度の本研究は、ヒト唾液中において唾液酵素がフタル酸ジエステルの加水分解反応に及ぼす影響について、その詳細を検討した。

B. 研究方法

試薬および器具

フタル酸モノエステル標準品：フタル酸モノエチル（MEP）は和光純薬社製（純度 90% 以上）を、フタル酸モノ-*n*-ブチル（MBuP）、フタル酸モノ-*n*-ヘキシル（MHxP）およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）それぞれは東京化成社製（それぞれの純度 90% 以上）を、フタル酸モノベンジル（MBeP）は東京化成社製（純度 98% 以上）をそれぞれ使用した（図-1）。フタル酸モノエステル標準品それぞれについて、ジエステル体以外の不純物がないことを薄層クロマトグラフにより確認した。また、GC/MS および HPLC それぞれにより、本分析に影響する妨害物質は認められなかった。

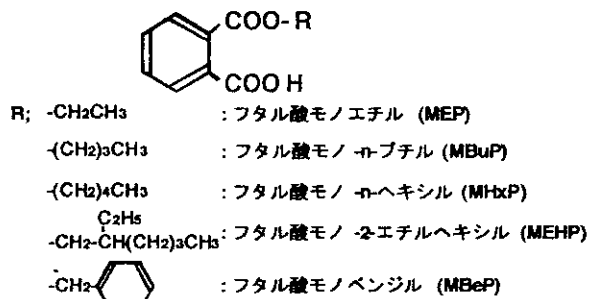


図-1 フタル酸モノエステルの構造式

フタル酸ジエステル標準品：フタル酸ジエチル（DEP）、フタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）それぞれは和光純薬社製（それぞれの純度 99.5% 以上）を、フタル酸-*n*-ブチルベンジルは関東化学社製（純度 98% 以上）を、フタル酸ジヘキシル（MHxP）は東京化成社製（純度 98% 以上）をそれぞれ使用した。

アセトニトリル（HPLC 用）、*n*-ヘキサン（フタル酸エステル・PCB 測定用）、酢酸エチル（残留農薬・PCB 測定用）およびメタノール（残留農薬・PCB 測定用）はそれぞれ関東化学社製を使用した。ジメチルスルホキシド（DMSO：生化学用）およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は和光純薬社製を、トリメチルシリルジアゾメタン（TMSD）は Aldrich 社製をそれぞれ使用した。また、本実験に使用した試薬は全てフタル酸ジエステルが含まれていないことを確認した。

フタル酸ジおよびモノエステル標準溶液：DEP、DBP、DHxP、DEHP、DEHP および MBuP の標準品それぞれを正確に 50 μmol 量り取り、10 ml の DMSO にそれぞれ溶解させ、これをフタル酸ジエステル標準溶液（5 $\mu\text{mol/ml}$ ）とした。

トリス-HCl 緩衝液（pH7.2）：24.3 mg/ml（0.2 M）トリス-ヒドロキシメチルアミノメタン 25 ml に、0.1M HCl を 45 ml を加え、0.1M HCl で pH を 7.2 に調整し、精製水で 100 ml に定容した。

1%SDS-トリス-HCl 緩衝液：1g の SDS を 100 ml のトリス-HCl 緩衝液（pH7.2）に溶解させた。

ミニカラム Oasis®HLB（3cc）：Waters 社製、

使用前に酢酸エチル 5 ml, メタノール 5 ml およ
び 0.1% 酢酸水溶液 10 ml で洗浄した。

本実験に使用したガラス器具は全て、使用前
に 230℃, 5 時間以上加熱し, 汚染のないよう放
冷後, アルミホイルにくるみ, 使用直前まで保
管した。

ヒト唾液

ヒト唾液は, インフォームドコンセント実施
後, フタル酸ジエステルを含まないことを確認
したポリエチレン製試験片 (縦 2.5×横 3.0 cm)
を成人被験者 15 人 (男性 10 人, 女性 5 人) の
口腔内に入れ, 15 分間チューイングし, 口腔内
に溜まった唾液をネジ蓋付 50 ml 遠心分離管に
採取した。採取は午前 9 時～10 時の間に行った。
採取量は 7～21 ml および pH は 7.3～7.9 であつ
た。採取した唾液を 3000 rpm, -5℃で 20 分間遠
心分離し, その上澄み液を 0.45 μm のメンブラ
ンフィルターでろ過し, 唾液試料とした。唾液
試料中のタンパク質濃度は和光純薬社製の尿中
総タンパク測定用マイクロ TP-テストワコー (ピ
ロガロールレッド法) により測定した。

装置

振とう培養器: UNI THERMOSHAKE,
NTS-2000, EYELA 社製

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS):
GCMS-QP5050, 島津製作所社製

紫外分光光度計検出器付高速液体クロマトグ
ラフィー (HPLC): LC-10A, 島津製作所社製

加水分解反応の活性の測定

唾液試料 1 ml にトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2)
1 ml およびフタル酸ジ及びモノエステル標準溶
液 10 μl を加え, 振とう培養器で 37℃, 30 分間
インキュベートした。振とう培養器の振とう数
は 140 shaking/分とした。インキュベーション終
了後, 直ちに 0.1N HCl で唾液試料の pH を約 2
に調整し, アセトニトリルを 1 ml 加え, 生成し
たモノエステルを振とう抽出した。その抽出液

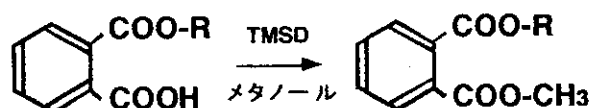


図-2 トリメチルシリルジアゾメタン (TMSD)による
フタル酸モノエステルのメチル化

に 0.1% 酢酸水溶液 7 ml を加え, よく混和し,
ミニカラム Oasis® HLB に負荷し, メタノール・
0.1% 酢酸水溶液 (1:9) 5 ml で洗浄し, メタノー
ル・酢酸エチル (9:1) 10 ml で生成したフタル
酸モノエステルを溶出した。溶出液をエバポレ
ーターで濃縮後, 窒素気流下で乾固させ, アセ
トニトリル 1 ml または酢酸エチル 0.5 ml に再溶
解させ, それぞれ HPLC 用または GC/MS 用試
験液とした。それぞれの試験液中のフタル酸モ
ノエステルを HPLC または, メチル化後
GC/MS-EI 分析した。フタル酸モノエステルの
メチル化は Hashimoto らの方法¹⁹⁾に従い, GC/MS
用試験液に 100 μl のメタノールを加え, 30 μl の
TMSD を, 室温で 30 分間反応させた (図-2)。
反応液を窒素気流下濃縮・乾固させ, n-ヘキサ
ン 1 ml に再溶解し, GC/MS-EI 分析した。

GC/MS 分析条件

フタル酸ジおよびモノエステルの GC 部の分
析条件を以下に示した; カラム, DB-1 (30 m×0.25
mm φ, 0.25 μm): カラム温度, 100℃ (1 分保
持)→10℃/分→200℃ (1 分保持)→10℃/分→250℃
(1 分保持)→5℃/分→270℃: 注入口温度,
260℃: インターフェース温度, 260℃。

MS 部の条件を以下に示した; イオン化法, EI
法: イオン化電圧, 70eV: イオン源温度, 260℃:
検出モード, SIM: フタル酸モノエステル測定
用イオン, m/z 163, 149, 91, 確認用イオン m/z 181
(MBuP, MHxP および MEHP) および m/z 176
(MEP): フタル酸ジエステル測定用イオン, m/z
149, 確認用イオン, m/z 177 (DEP), m/z 223
(DBP), m/z 206 (BBP), m/z 251 (DHxP), m/z
167 (DEHP)。

本条件より得られたフタル酸ジおよびモノエ

表-1 GC/MSによるメチル化フタル酸モノエステル及びフタル酸ジエステルの保持時間及び特徴的なフラグメントイオン

フタル酸エステル	分子量	保持時間 (分)	m/z (相対強度, %)
メチル化フタル酸モノエステル			
フタル酸モノエチル	206	8.2	163(100) 149(59) 179(16)
フタル酸モノイソブチル	226	10.5	183(100) 149(73) 181(13)
フタル酸モノイソヘキシル	264	13.0	183(100) 149(79) 181(19)
フタル酸モノn-エチルヘキシル	292	14.8	183(100) 149(55) 181(25)
フタル酸モノベンジル	270	16.1	91(100) 163(69) 149(31)
フタル酸ジエステル			
フタル酸ジエチル	222	9.0	149(100) 177(19) 105(11)
フタル酸ジイソブチル	278	13.6	149(100) 150(9) 104(5)
フタル酸ジイソブチルベンジル	312	21.2	149(100) 91(83) 208(19)
フタル酸ジイソヘキシル	334	21.5	149(100) 85(19) 251(8)
フタル酸ジn-エチルヘキシル	360	26.9	149(100) 167(31) 279(8)

ステルの保持時間、およびそれぞれのマススペクトルより得られた特徴的なフラグメントイオンを表-1に示した。

HPLC 分析条件

フタル酸 (PA) およびフタル酸モノエステルの HPLC 分析条件を以下示した; カラム, Inertsil C8-3 (4.6×250 mm); カラム温度, 40℃; 移動相, 0.1%酢酸溶液 (5.0 mmol/l リン酸二水素テトラブチルアンモニウム溶液含有) -アセトニトリル (50:50); 流速, 1.0 ml/分; 検出器, UV (検出波長 254 nm); 注入量, 10 µl.

本条件より得られた, PA およびフタル酸モノエステルの HPLC クロマトグラムを図-3 (後に示す) 示した。

C. 結果および考察

DBP からの MBuP 生成に及ぼす唾液酵素の影響

成人被験者より分泌されたヒト唾液中での, symmetric なフタル酸ジエステル (DEP, DBP, DHxP および DEHP それぞれ 12.5 nmol) のインキュベーションにより生成されたフタル酸モノエステルの GC/MS クロマトグラムを図-4に示した。(後に示す) m/z 163 の SIM クロマトグラム上に MBuP と MHxP のピークが顕著に認められた。また MEHP のピークは検出されなかった。そこで, 生成量が最も多かった DBP の加水分解による MBuP 生成に及ぼす唾液, とくに唾液酵素の影響について詳細に検討した。DBP の添加量は 50 nmol とした。

ヒト唾液 (全唾液), その唾液を遠心分離し, メンブランフィルターでろ過した上澄み, およ

表-2 ヒト唾液のインキュベーションによる DBPからのMBuP生成量

ヒト唾液	添加生成物	DBP	DBP + SDS
		MBuP生成量 (nmol)	
全唾液		22.4 ± 9.8	—
上澄み (3000rpm, -5℃)		19.0 ± 9.1	n.d
沈殿 (3000rpm, -5℃)		4.8 ± 3.3	—

DBP添加量: 50 nmol

ヒト唾液: 成人被験者より分泌された唾液 (全唾液), およびその唾液を 3000rpm, -5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過し得られた上澄み, およびトリス-HCl緩衝液 (pH7.2) に再溶解した沈殿。

インキュベーション条件

: ヒト唾液 1ml にトリス-HCl緩衝液 (pH7.2) 1ml を加え, 37℃, 30分間, 振とうした。試験は 5回行った。

n.d. : 0.1 nmol 以下

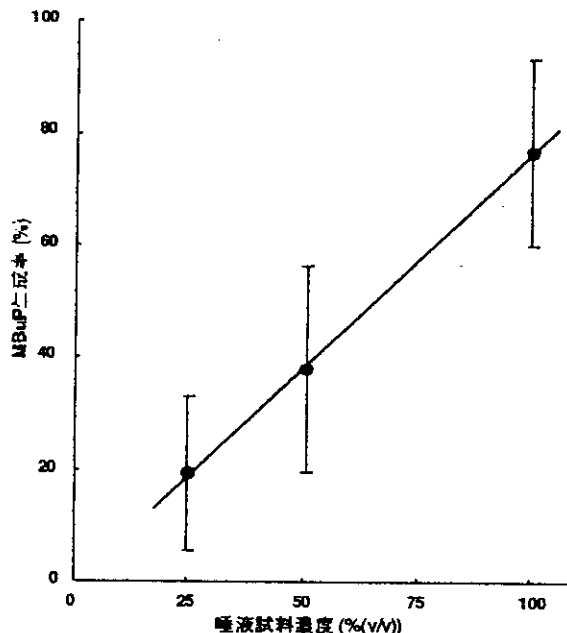


図-5 DBPからのMBuP生成率に及ぼすヒト唾液濃度の影響

DBP添加量: 50 nmol

唾液試料: 成人被験者より分泌された唾液を 3000 rpm, -5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 µm メンブランフィルターでろ過し得られた上澄み。

インキュベーション条件

: ヒト唾液 1ml にトリス-HCl緩衝液 (pH7.2) を加え, 2ml とし 37℃, 30分間振とうした。試験は 5回行った。

びトリス-HCl 緩衝液に再懸濁させた沈殿それぞれの, DBP のインキュベーションによる MBuP 生成量を表-2に示した。食物残渣や細胞片を除去し, 無菌的にした唾液の上澄みについて, 全唾液と同等の MBuP 生成が認められた。またその上澄みに 1% SDS-トリス-HCl 緩衝液を加え, 同様に DBP をインキュベーションしたところ, MBuP の生成は認められなかった。これは 1% SDS 溶液がタンパク質を変性させ, 酵素を失活させたと考えられた¹³⁾。以下, 上澄みを唾液試料とし実験した。

DBP からの MBuP 生成率に及ぼす唾液試料濃度の影響を図-5に示した。唾液試料の濃度を

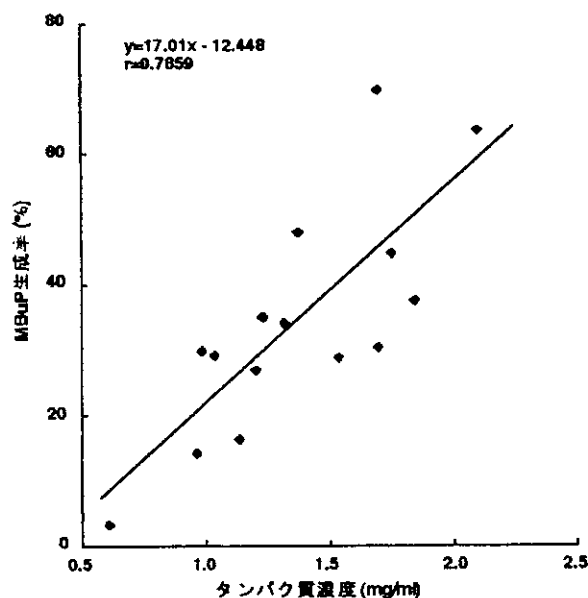


図-6 DBPからのMBuP生成率に及ぼす唾液試料中のタンパク質濃度の影響
 DBP添加量: 50 nmol
 唾液試料: 成人被験者 15人より分泌された唾液それぞれを 3000 rpm, -5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過して得られた上澄み。
 タンパク質濃度: ビロガロールレッド法に従って測定した。
 インキュベーション条件: ヒト唾液 1 mL にトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) 1 mL を加え, 37℃, 30分間振とうした。

100% (v/v) とし, これをトリス-HCl 緩衝液で希釈して, 50 および 25% (v/v) 濃度の唾液試料をそれぞれ調整した。唾液試料を緩衝液で希釈するほど, MBuP 生成率が小さくなり, MBuP 生成率と唾液試料濃度との間には正の比例関係が認められた。また, 成人被験者 15 人それぞれの唾液試料のインキュベーションによる MBuP 生成率に及ぼす唾液試料中のタンパク質濃度の影響を図-6 に示した。MBuP 生成率が高い唾液試料ほど, その試料中のタンパク質濃度が高く, MBuP 生成率とタンパク質濃度との間には有意な相関関係が認められた。その相関係数は 0.7859 であった。以上の結果より, ヒト唾液中での DBP からの MBuP 生成反応は生体由来の唾液タンパク質, 特に唾液酵素の関与が明らかとなった。唾液酵素には主に, 加水分解酵素であるアミラーゼ, 舌リパーゼ及びリゾチームの存在が明らかにされている¹¹⁾。

DBP からの MBuP 生成率に及ぼすインキュベーション温度及び唾液 pH の影響を図-7 および 8 にそれぞれ示した。MBuP の生成は温度及び pH

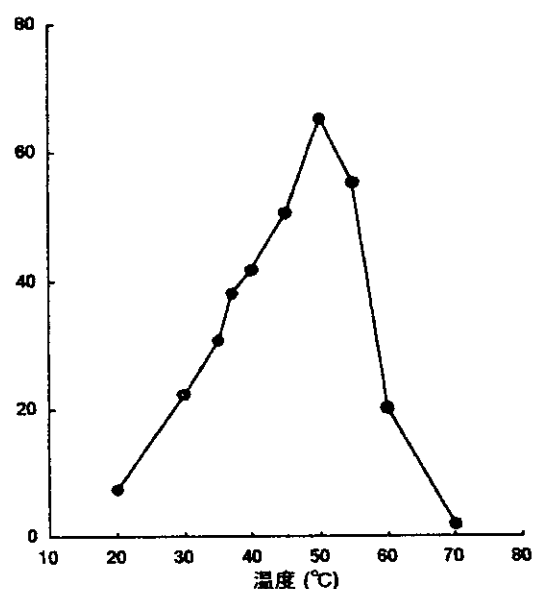


図-7 DBPからのMBuP生成率に及ぼすインキュベーション温度の影響
 DBP添加量: 50 nmol
 唾液試料: 成人被験者より分泌された唾液を 3000 rpm, -5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過して得られた上澄み。
 インキュベーション条件: ヒト唾液 1 mL に Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) 1 mL を加え, 各温度で, 30分間, 振とうした。試験は 5 回行った。

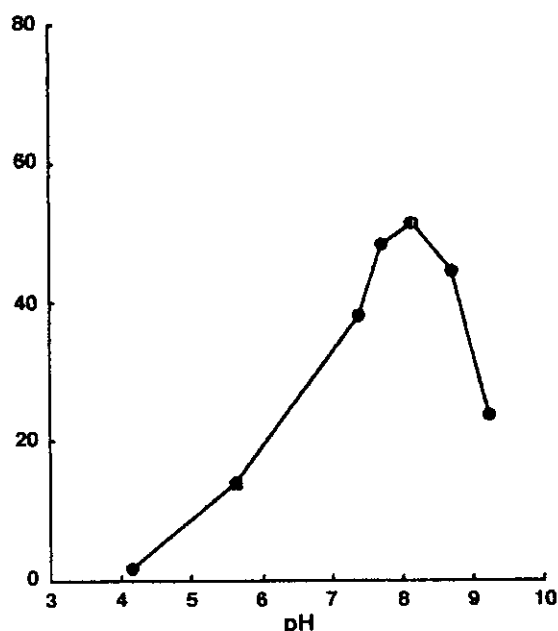


図-8 DBPからのMBuP生成率に及ぼす唾液 pH の影響
 DBP添加量: 50 nmol
 唾液試料: 成人被験者より分泌された唾液を 3000 rpm, -5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過して得られた上澄み。
 インキュベーション条件: ヒト唾液 1 mL に Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) 1 mL を加え, 37℃, 30分間, 振とうした。試験は 5 回行った。

それぞれに対し最大活性を示し, 反応至適温度及び pH の存在が認められた。その至適温度は 50℃ にあり, 60℃ 以上でその活性は著しく低下した。一般にヒト等の生体内酵素の至適温度は

表-3 ヒト唾液酵素のフタル酸ジエステルおよびモノエステルに対する活性

基質		生成物	フタル酸モノエステルおよびフタル酸生成量 (nmol/mg [(nmol/ml)])		
			唾液試料	粗酵素液	精製リパーゼ
フタル酸ジエステル					
DEP	MEP	5.9 [9.1]	0.6	1.8	
DBP	MBP	12.4 [19.0]	5.2	2.9	
DHxP	MHxP	8.6 [13.1]	1.3	3.2	
DEHP	MEHP	0.5 [0.8]	0.1	0.3	
BBP	MBP	0.4 [0.6]	0.2	0.2	
	MBeP	2.0 [3.0]	2.2	1.4	
フタル酸モノエステル					
MBP	PA	n.d. [n.d.]	n.d.	n.d.	

基質添加量 : 50 μ mol
 唾液試料 : 成人被験者より分泌された唾液 (全唾液) およびその唾液を 3000 rpm, 5℃, 20分間遠心分離し, 0.45 μ ml のメンブランフィルターでろ過し得られた上澄み。
 粗酵素液 : ヒト唾液 20 ml に -5℃ で冷アセトン 25 ml を添加し, 3000 rpm, 5℃, 30分間遠心分離し, 生じた沈殿 (アセトン粉末) をトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) 5 ml に再溶解した。
 精製リパーゼ : プタ酢酸リパーゼ (東京化成製) 2mg をトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) 5 ml に溶解した。
 インキュベーション条件 : ヒト唾液 1 ml にトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) 5 ml を加え, 37℃, 30分間震とうした。試験は被験者 5 回行った。
 n.d. : 0.1nmol 以下

体温に近い 35~40℃にあるといわれているが, DBP に対する唾液試料中での酵素反応は, その反応液の化学的及び物理的状态に影響を与える多様な因子の影響により, 比較的高温の 50℃付近に至適温度が認められたと思われる。Fritz と Meilius は, プタ酢酸リパーゼがタウロコール酸存在下, トリブチリンに対して 45℃で, トリオレインに対して 50℃付近で最高活性を示したことを報告している¹⁴⁾。また, 反応至適 pH は 8.0 で認められた (図-8)。ヒトの膵臓, 胃, 十二指腸およびミルク中のリパーゼそれぞれのトリグリセリドに対する反応至適 pH はそれぞれ 8.0, 4~8, 6~9 および 8.0~9.0 であることが様々な研究者によって報告されている^{15,16,17)}。

アルキル基の異なるフタル酸ジエステルおよびモノエステルの加水分解反応に対する唾液酵素の活性

唾液試料中の酵素のフタル酸ジエステル及びモノエステルに対する活性を表-3 に示した。唾液試料中での symmetric なフタル酸ジエステルからのフタル酸モノエステル生成量は MBP > MHxP > MEP > MEHP であった。その MBuP 生成量に対する MHxP, MEP および MEHP それぞれの生成量の比率は 0.69, 0.48 および 0.04 であった。また, 唾液試料 20 ml に -5℃ にて冷アセトンを 25 ml ゆっくり加え, その遠心分離によ

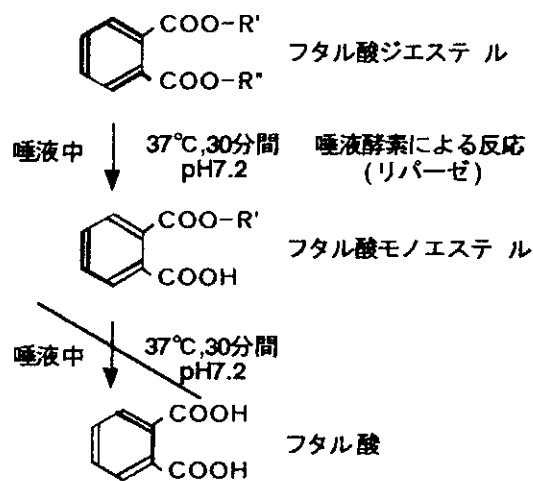


図-9 ヒト唾液酵素によるフタル酸ジエステルの加水分解

り分離されたアセトン粉末 (沈殿物) を, トリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) 5 ml に再溶解することにより唾液試料の粗酵素液を得た。その粗酵素液のモノエステル生成量も MBuP > MHxP > MEP > MEHP であり, 唾液試料と同等の基質特異性が認められた。その MBuP 生成量に対する MHxP, MEP および MEHP それぞれの生成量の比率は 0.25, 0.12 および 0.02 であった。また, asymmetric な BBP からは MBuP の生成がわずかであり, MBeP の生成が顕著であった。

以上より, 唾液酵素はフタル酸ジエステルの直鎖のアルキル基, 特に炭素数 4 のブチル基に強い基質特異性を示し, 側鎖を持つ 2-エチルヘキシル基およびベンジル基にはほとんど加水分解活性を示さなかった。また, 唾液試料および粗酵素液中での MBuP のインキュベーションによるフタル酸 (PA) の生成は認められず, フタル酸モノエステルの加水分解反応には関与していなかった。

また, プタ酢酸リパーゼ (東京化成社製) をトリス-HCl 緩衝液 (pH7.2) に溶解させ, 同様にインキュベーションしたところ, 唾液酵素と同等の基質特異性が認められた。Shahani らはウシのミルク中のリパーゼが炭素数 4 のトリブチリンに強く作用し, 溶液状のモノエステルには作用しないことを報告している¹⁷⁾。また, 哺乳

期の幼動物の“oral lipase”の乳脂の分解により酪酸（C4）の遊離が顕著であることが報告されている¹⁸⁾。これらの結果より、唾液中のフタル酸ジエステルからモノエステルへの脱エステル反応（加水分解反応）は唾液中のエステラーゼ、特にリパーゼの関与があきらかとなった（図-9）。またこれらは、フタル酸モノエステルの脱エステルによるフタル酸生成反応にその活性を示さなかった。

D. 結論

1. ヒト唾液中でフタル酸ジエステルからのモノエステル生成反応は生体由来の唾液酵素の関与が認められ、この酵素反応の至適温度は50℃、および至適pHは8.0であった。
2. 唾液酵素は直鎖のアルキル基、特に炭素数4のブチル基に強い基質特異性を示し、側鎖を持つ2-エチルヘキシル基およびベンジル基にはほとんど加水分解活性を示さなかった。
3. 唾液中のフタル酸ジエステルからモノエステルへの加水分解は唾液中のエステラーゼ、特にリパーゼが大きく関与し、またこれらは、モノエステルの脱エステルによるフタル酸生成反応に対するエステラーゼとしての活性が示されないことが明らかとなった。

E. 参考文献

- 1) 杉田, 平山, 新野, 石橋, 山田, 食品衛生学会誌, 42, 48-55 (2001)
- 2) 新野, 石橋, 伊藤, 坂井, 杉田, 石綿, 山田, 小野寺, 日本食品化学会誌, 8, 194-199 (2001)
- 3) Miyakoda, et al., *J. Health. Sci.*, 46, 269-274 (2000)
- 4) Ema, M. and Miyawaki, E., *Reprod. Toxicol.*, 15, 189-194 (2001)
- 5) Weghorst C.M., et al., *Exp. Toxicol. Pathol.*, 45, 423-31 (1994)
- 6) Ledwith B.J., et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 3707-3714 (1997)
- 7) Isenberg J.S., et al., *Toxicol. Sci.*, 56, 73-85 (2000)
- 8) Niino, T., et al., *J. Health. Sci.*, 47, 318-322 (2001)

- 9) Lake, B.G., et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39, 239-248 (1977)
- 10) Rowland, et al., *Food Cosmet. Toxicol.*, 15, 17 (1977)
- 11) Donald, I.H. and William, H.B., “Saliva and oral health” (ed. Edgar, W.M., O’Mullane) British Dental Association, London, p.117-136 (1997)
- 12) Hashimoto, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1475-1478 (1981)
- 13) ロバート K. S., “新・タンパク質精製法”(塚田訳), Springer 東京, p52 (1995)
- 14) Fritz, P.J. and Melius, P., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41, 719 (1954)
- 15) Berner, D.L. and Hammond, E.G., *Lipid*, 5, 558 (1970)
- 16) Cohen, M., et al., *Gastroenterology*, 60, 1 (1971)
- 17) Chandan, R.C. and Shahani, K.M., *J. Dairy, Sci.*, 46, 503-509, (1963)
- 18) 岩井美枝子, 科学と工業, 52, 93 (1978)

F. 研究発表

論文発表

- Niino, T., Ishibashi, T., Itho, T., Sakai, S., Ishiwata, H., Yamada, T., and Onodera, S., *J. Health. Sci.*, 47, 318-322 (2001)

新野, 石橋, 伊藤, 坂井, 杉田, 石綿, 山田, 小野寺, 日本食品化学会誌, 8, 194-199 (2001)

- Niino, T., Ishibashi, T., Itho, T., Sakai, S., Ishiwata, H., Yamada, T., and Onodera, S., Comparison of Diisononyl Phthalate Migration from Polyvinyl Chloride Products into Human Saliva *in vivo* and into saliva simulant *in vitro*, *J. Health. Sci.*, (In press)

- Niino, T., Ishibashi, T., Itho, T., Sakai, S., Ishiwata, H., Yamada, T., and Onodera, S., Simultaneous determinations of phthalate di- and mono-esters in polyvinyl chloride products and human saliva by GC/MS, *J. Chromatogr.*, (In press)

学会発表

新野, 石橋, 伊藤, 坂井, 杉田, 石綿, 山田, 小野寺, フォーラム 2001: 衛生薬学・環境トキシコロジー (金沢)

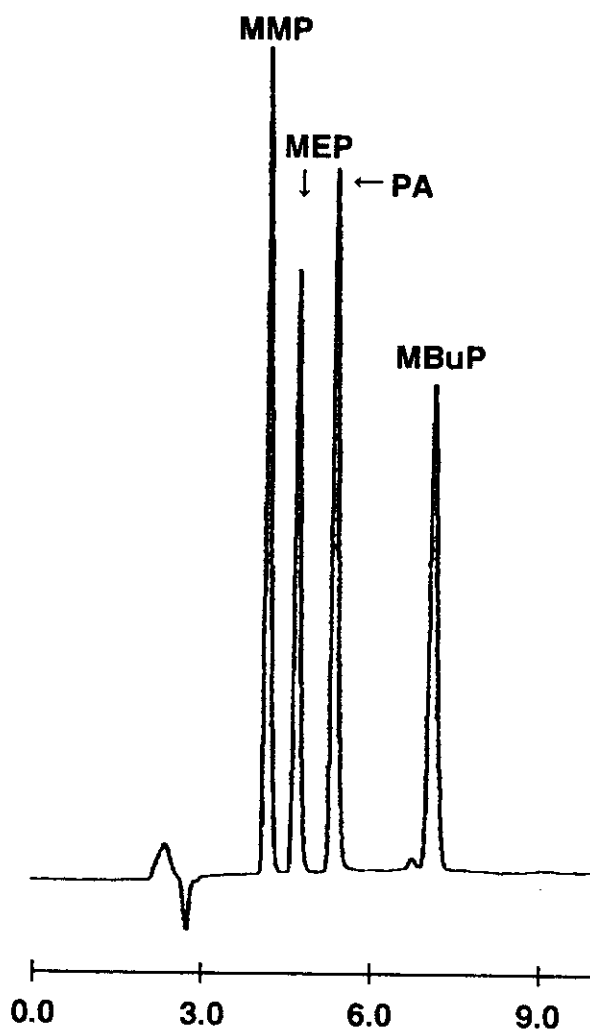


図-3 フタル酸(PA)およびフタル酸モノエステルの
HPLCクロマトグラム
 PAおよびフタル酸モノエステル：各々100ng
 MMP:フタル酸モノメチル, MEP:フタル酸モノエチル
 MBuP:フタル酸-n-ブチル

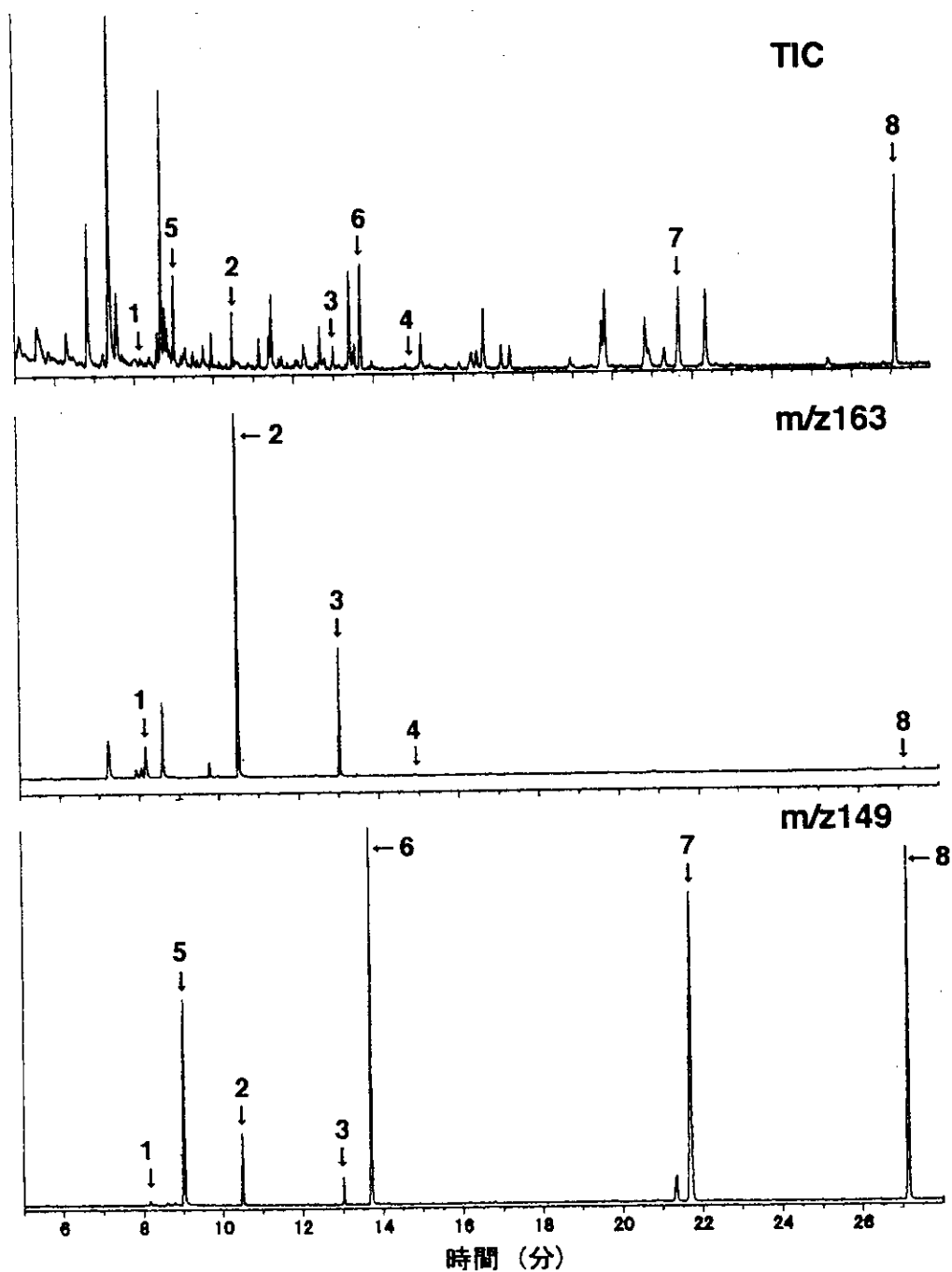


図-4 ヒト唾液中のメチル化フタル酸モノエステル及びフタル酸ジエステルのGC/MSクロマトグラム。
 成人被験者より分泌された唾液1 mlにフタル酸ジエステルを各々12.5 nmol添加し、
 Tris-HCl緩衝液(pH7)1 mlを加え、37℃、30分間インキュベートした。
 ピーク; 1, MEP: 2, MBuP: 3, MHxP: 4, MEHP: 5, DEP: 6, DBP: 7, DHxP: 8, DEHP

瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のノニルフェノールの分析

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）

研究協力者 益川邦彦（神奈川県衛生研究所）

平山クニ（神奈川県衛生研究所）

藤巻照久（神奈川県衛生研究所）

研究要旨

平成 11 年度に瓶詰食品（輸入品 35、国産品 15 検体）のキャップシーリング材について、内分泌かく乱作用が疑われているフタル酸エステル等の可塑剤、ビスフェノール A（BPA）の使用動向を報告した。今年度はこれら製品のノニルフェノール（NP）について調査を実施した。50 検体中 10 検体（輸入品 4 検体、国産品 6 検体）から 56.1-1410ppm の範囲で NP が検出された。

A. 研究目的

フタル酸エステル（PAE）、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHA）等の可塑剤、ビスフェノール A（BPA）およびノニルフェノール（NP）は内分泌かく乱作用が疑われている化合物である。瓶詰食品のキャップシーリング材はポリ塩化ビニル製（PVC）であるため、これら化学物質が使用されている可能性があり、11年度は可塑剤およびBPAについて調査を実施した。今年度はNPを分析し、1999年当時の製品の実態を調査した。

B. 実験方法

B・1 試薬

ノニルフェノール（4-nonylphenol）：環境分析用、関東化学社

n-ヘキサン：残留農薬用 1000、和光純薬工業社

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業社

水：MILLIPORE Simpli Lab-UV（日本ミリポア社）で精製した純水

固相抽出カートリッジ：メガボンドエリート C18 充填量 1g（Varian 社製）

B・2 試料

1999 年に横浜市周辺で購入した瓶詰食品（国産品 15 検体及び輸入品 35 検体）のキャップシーリング材 50 検体を用いた。

B・3 装置及び分析条件

装置

ガスクロマトグラフ：HP6890 SERIES（Agilent 社製）

ガスクロマトグラフ/質量分析計：ガスクロマトグラフ HP5890 SERIES II（Agilent 社製）、質量分析計 Automass20（日本電子社製）

GC 分析条件

カラム：HP-5（内径 0.32mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μ m、Agilent 社製）、カラム温度：150 $^{\circ}$ C（1min）－ 20 $^{\circ}$ C/min － 250 $^{\circ}$ C（24min）、検出器：FID、注入口温度：220 $^{\circ}$ C、検出器温度：250 $^{\circ}$ C、キャリアーガス：He 2mL/min、注入方式：スプリット

(20:1)、注入量：1 μ L

GC/MS 分析条件

カラム：DB-5ms (内径 0.25mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μ m、J & W Scientific 社製)

カラム温度：50 $^{\circ}$ C (1min) - 20 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C (10min)、注入口温度：220 $^{\circ}$ C、インターフェイス温度：250 $^{\circ}$ C、キャリアガス：He 1.2mL/min、注入方式：スプリットレス、注入量：2 μ L、

イオン化電圧：70eV、測定モード 検索用：SCAN (m/z 50 ~ 500)、定量用：SIM (m/z 107、135、149)

B・4 試料の前処理

試料 0.2g をヘキサン 50mL で抽出後、10mL を分取し、減圧下で濃縮乾固した。残渣を 5%水-アセトニトリル溶液 2mL に溶解した。メタノール 10mL 及び 5%水-アセトニトリル溶液 10mL でコンディショニングした C18 ミニカラムに上記の 5%水-アセトニトリル溶液 2mL を負荷し、5%水-アセトニトリル溶液 6mL で溶出した。最初の 2mL は捨て、次の 4mL を分取し、これに水 6mL を入れ、ヘキサン 5mL で抽出して試験溶液とした。

C. 研究結果および考察

C・1 NP の定量

NP の GC/MS-SIM による定量についてはいくつか報告されているが、河村ら¹⁾の方法を参考とした。各種フラグメントイオンのピークが NP 全体を代表すると考え、それぞれのベースピークイオンを用いて定量し、最高及び最低値を除く測定値の平均値を定量値とした。測定に用いた 6 本のピーク (Fig.1) とその保持時間、ベースピークイオン及び特徴的なフラグメントイオンを Table1 に示した。6 本のピークの検量線

はいずれも 0.2 ~ 10ng の範囲で直線性が見られた。また、操作ブランク ($n=6$) は 0.1637 ± 0.0007 ppm であった。従って、定量値は操作ブランク値の 0.17ppm を測定値から引いた値とし、定量下限値は、10 σ が 0.007ppm であることから 0.01ppm とした。材質における検出限界は 2.5ppm である。なお、各種シーリング材質中の NP について GC/MS-SIM により測定行ったところ、検出された NP は、ほぼ標準品と同じパターンを示した。

GC/MS-SIM における分析値を Table2 に示した。GC (FID) で存在が疑われたものについてのみ GC/MS-SIM で分析した。Table2 の可塑剤及び BPA の結果については平成 11 年度に報告したものであり、参考までに記載した。50 検体中 10 検体 (輸入品の 4 検体、国産品の 6 検体) に NP が 56.1-1410ppm の範囲で検出された。検出レベルは既に河村ら¹⁾が報告している他の PVC 製品と変わらないレベルであった。NP の検出率は BPA より高かった。また、BPA は国産品からは検出されなかったが、NP は国産品からの検出率が高かった。NP が検出された試料はフタル酸エステル、特に国産品の場合はフタル酸ジ 2-エチルヘキシルが検出されるものが多かった。

NP が検出された製品には脂質の多い食品が入っていたものがあり、食品への溶出も考えられた。

D. 結論

調査した試料は 1999 年に入手した製品の 20%から NP が検出されたが、化学物質の内分泌かく乱作用が注目されるようになってから、添加剤の代替えが行われていることが言われていることから、最近の製品

の調査も必要である。

E. 文献

- 1) 河村葉子、前原玉枝、飯嶋広代、山田隆
：食品衛生学雑誌、41、212(2000)

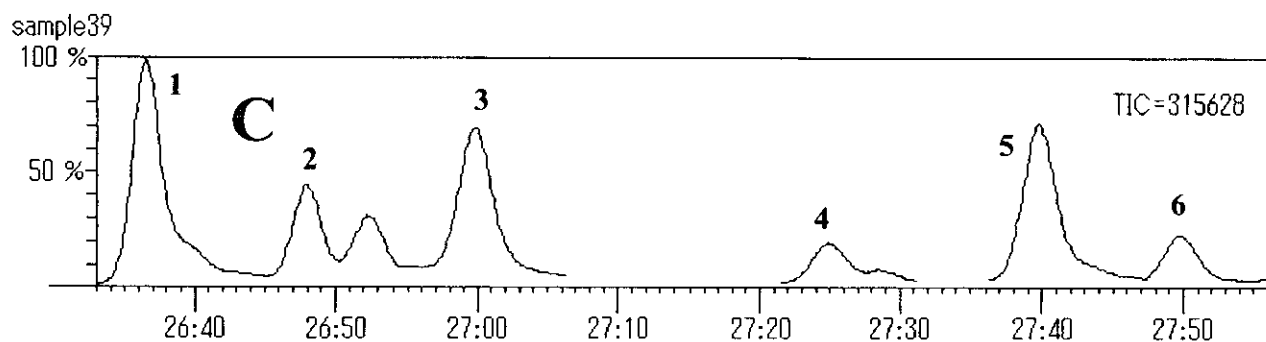
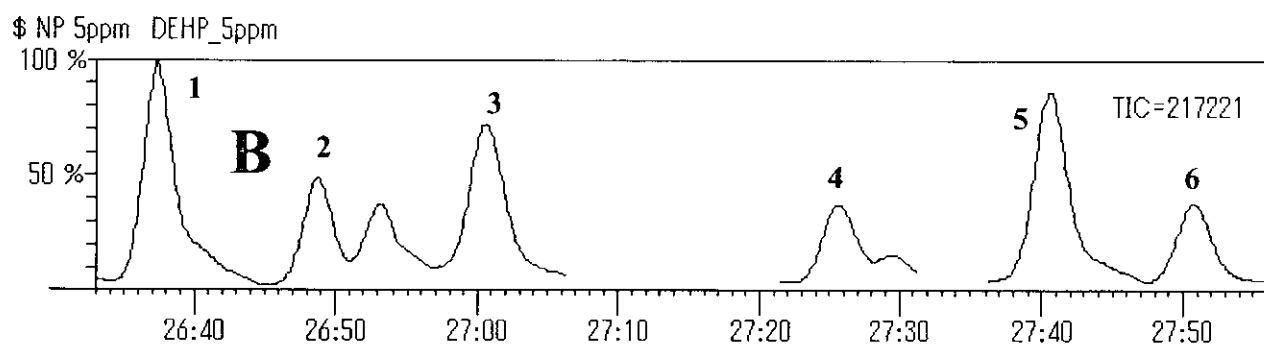
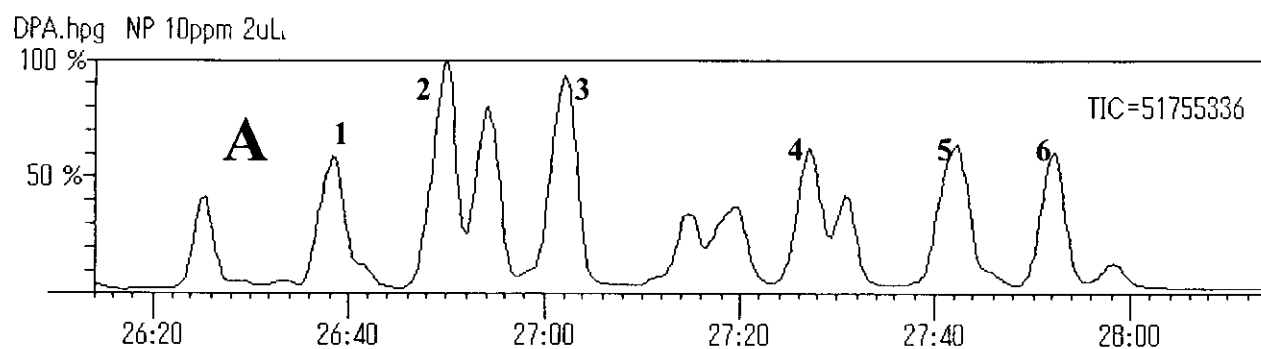


Fig.1 GC/MS-SCAN and SIM total ion chromatogram of nonylphenol and sample

A :Nonylphenol 20ng SCAN mode

B :Nonylphenol 10ng SIM mode

C :Sample No.39 SIM mode

Peak number:see Table 1

Table 1. Retention Times and Fragment Ions of Nonylphenol Isomer Peaks

Peak number	Retention time (min)	Base peak ion (m/z)	Characteristic ions (m/z)				
1	26.63	135	107	134	136	121	95
2	26.83	107	149	121	135	191	148
3	27.00	135	121	107	149	134	136
4	27.45	149	107	121	148	55	177
5	27.70	135	107	134	136	121	149
6	27.87	149	107	121	148	55	150

Table2 Plasticizers, BPA and NP in cap sealing resin of bottled foods purchased in 1999

No	contents	Plasticizer					BPA (μ g/g)	NP (μ g/g)	country
		DEHP(%)	DEHA(%)	DIDP(%)	DINP(%)	Other			
1	pasta sauce	nd	nd	33.6	nd		nd	56.1	America
2	peanut cream	nd	nd	nd	nd		nd	nd	America
3	peanut product	nd	nd	nd	nd		nd	116	America
4	strawberry jam	nd	nd	33.0	nd		1.5	nd	America
5	takos sauce	nd	nd	34.0	nd		nd	nd	America
6	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	262	America
7	raspberry jam	nd	nd	35.7	nd		nd	nd	England
8	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
9	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
10	straied tomato	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
11	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
12	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
13	tomato sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Italy
14	curry pasta	nd	nd	nd	nd		nd	nd	India
15	curry powder	21.3	nd	nd	nd		nd	nd	India
16	Mexican sauce	nd	nd	28.9	nd		1.0	nd	Australia
17	dressing	nd	nd	28.7	nd		nd	nd	Australia
18	mushroom	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Holland
19	strawberry jam	nd	nd	40.7	nd		nd	nd	Canada
20	raspberry jam	nd	nd	35.4	nd		nd	nd	Switzerland
21	olive	22.4	nd	nd	nd		nd	nd	Spain
22	pickles	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Spain
23	grape jam	nd	nd	37.6	nd		4.4	nd	Spain
24	corn	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Thailand
25	hot sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Thailand
26	tomuyan paist	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Thailand
27	tohgarasi miso	nd	nd	30.6	nd		620	380	Korea
28	natural cheese	nd	nd	nd	24.5		nd	nd	Denmark
29	mustard	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Germany
30	pickles	nd	nd	34.3	nd		nd	nd	Turkey
31	shrimp meat	nd	nd	35.9	nd		nd	nd	Philippines
32	mustard	nd	nd	nd	nd		nd	nd	France
33	strawberry jam	nd	nd	26.0	nd		270	nd	France
34	apricot jam	nd	nd	36.6	nd		nd	nd	Belgium
35	bamboo shoots	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Taiwan
36	tobannzyan	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
37	menma	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
38	caper pickles	nd	nd	nd	nd	DALG	nd	nd	Japan
39	sauce	20.8	nd	nd	nd		nd	360	Japan
40	sauce	29.4	nd	nd	nd		nd	531	Japan
41	fishery product	26.1	nd	nd	nd		nd	718	Japan
42	sesame cream	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
43	pasta sauce	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
44	tsukudani	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
45	mayonnaise	25.5	nd	nd	nd		nd	298	Japan
46	miso	nd	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
47	tsukudani	nd	nd	nd	nd		nd	1410	Japan
48	mushroom	nd	nd	nd	nd	DALG	nd	nd	Japan
49	tsukudani	31.2	nd	nd	nd		nd	nd	Japan
50	dressing	19.6	nd	nd	nd		nd	365	Japan

平成 13 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

アルコール飲料中のビスフェノール A(BPA)、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル
(BADGE)関連化合物に関する研究

-LC/MS/MS 法による分析法開発と市販製品の分析-

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究協力者 山下 博、望月 直樹、奈良部 雄、表 雅之

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／タンデム質量分析法(LC/MS/MS)によるアルコール飲料中のビスフェノール A(BPA)並びにビスフェノール A ジグリシジルエーテル(BADGE)関連化合物の高感度一斉分析法を開発した。本法により各種のアルコール飲料について調査した結果、輸入品等の特定の製品から BPA 及びビスフェノール A ジグリシジルエーテル加水分解物(BADGE.2H₂O)等の化合物を微量検出した。これらは、主に缶内面塗装に使用された塗料の種類並びにその品質などの要因によるものと推定された。

A. 研究目的

缶飲料用のアルミ、スチール缶等の内面塗装には、エポキシ樹脂系塗料及びビニル樹脂系塗料が使用されており、これら塗料原料樹脂由来のビスフェノール A(BPA)ならびに BADGE 類が中身製品に移行する可能性が指摘されている。また、アルコール濃度の高い酒類では、製造工程で設備等から混入が起こること等も懸念される。

本研究では液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により、BPA 並びに BADGE 関連化合物の一斉分析法を開発することを目的とした。さらに、この方法を用いて市販のアルコール飲料について調査を行った。また、特定の成分が検出された製品については、その移行原因について考察した。

B. 研究方法

B.1 試薬・試料

前処理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；和光純薬工業製)、アセトニトリル(HPLC 用試薬；関東化学製)、酢酸アンモニウム(特級試薬；関東化学製)を用いた。また、精製水(HPLC 用；関東化学製)を使用した。

標準品として BPA、BPA-d₁₆(環境分析用試薬；関東化学製)及び BADGE、BADGE.H₂O、BADGE.2H₂O、BADGE.HCl、BADGE.2HCl、BADGE.H₂O.HCl(分析用標準試薬；Fluka 社製)を使用し、各々をメタノールに溶解して 10 µg/mL の標準溶液を用時に調製し、適宜希釈して試験に用いた。

市販アルコール飲料として、平成 14 年 1 月上旬に東京都及び茨城県内の酒販店にてビール、リキュール類、果実酒、焼酎、ウイスキーなど主要製品約 150 点を購入し試料とした。

B.2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ装置は、Waters 社製 2690 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、Waters 社製 XTerra ODS 150 mm×2.1 mm I.D.(5 μ m)を使用した。質量分析計(MS)は、Micromass 社製 Quattro-Ultima 型タンデム質量分析計(MS/MS)を ESI モードにて使用した。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。

フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)は、島津製作所製 FTIR-8700 型に同社製赤外顕微鏡 AIM-8000R を組み合わせて反射モードにて使用した。

B.3 LC/MS/MS 測定条件

HPLC はカラム温度を 40℃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 95%になる様にグラジエント溶出を行った。また MS/MS 感度の高感度化ならびに安定化のため、酢酸アンモニウムを 0.5 mM となる様に混合した。オートサンプラーの

バイアルトレイ部分は 20℃に設定し、試料を 24 時間以内に分析する様に装置を動作させた。

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及びポジティブモードを切り替えて動作させ、イオン源温度は 120℃、Desolvation 温度は 300℃とした。また測定は、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)としネガティブモードにて BPA(m/z 227→212)、BPA-d₁₆(m/z 241→142)の各イオンを、またポジティブモードにて BADGE(m/z 358→191)、BADGE.H₂O(m/z 376→209)、BADGE.HCl(m/z 394→227)、BADGE.2H₂O(m/z 394→135)、BADGE.H₂O.HCl(m/z 412→227)、BADGE.2HCl(m/z 430→227)の各イオンを測定した。

なお、衝突エネルギー等の測定条件は Table 1 にまとめて記載した。また、クロマトグラムの一例を Fig.1 に示した。

B.4.1 アルコール飲料の試験

ビール、リキュール類などでアルコール濃度が約 5%の試料は以下の方法で試験を行った。即ちガス抜きした試料 50 mL を量りとり、内標準溶液(BPA-d₁₆, 5 μ g/mL) 50 μ L 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少量により脱水した。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。これにメタノールを加えて、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 10 μ L 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、BPA- d_{16} 、BADGE、BADGE.H₂O、BADGE.HCl、BADGE.2H₂O、BADGE.H₂O.HCl 及び BADGE.2HCl の各々のピーク面積から、内標準法(BPA)または絶対検量線法(BADGE 類)により、予め作成した検量線を用いて、各成分の定量を行った。なお、ウイスキー試料の BADGE 類は、標準添加法を用いて定量を行った。

B.4.2 高アルコール飲料の試験

ウイスキー、焼酎などでアルコール濃度が 25%以上の試料は以下の方法で試験を行った。即ち製品記載のアルコール濃度により、試料を精製水で 2 倍に希釈してアルコール濃度を 20%以下に調整した。この液からアルコール飲料 50 mL 相当量を量り試料とした。この液を上記 B.4.1 に従い試験して、試料中の各化合物の定量を行った。

B.5 缶胴及び缶蓋塗装の材質判別

缶体の缶蓋及び缶胴部分などを試料から切り取り、赤外顕微鏡を用いて反射法により、表面塗膜の赤外吸収スペクトルを測定した。測定は分解能 16 cm⁻¹とし、測定波数領域 700~4000 cm⁻¹、積算回数 20 回とした。このスペクトルを塗膜標準品のスペクトルと比較して、使用された塗料の種類を判別した。

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

各成分の標準試料及び夾雑成分の多いと考えられるビール試料を用いて、イオン化法、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。

始めにイオン化法について標準試料を用いて検討した結果、BPA の測定には ESI ネガティブモード、また BADGE 類の測定は ESI ポジティブモードが適当と考えられた為、これらのイオン化法を選択した。次に各標準試料を 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。この結果をもとに、化合物毎に至適ペアレントイオン及びドーターイオン、並びに衝突(コリジョンセル)エネルギーを設定した。

次に MS/MS 部を上記条件にて稼動して、ビール、リキュール、焼酎、ウイスキーの代表的製品を試料として LC 移動相組成に関して検討した。その結果、いずれの試料でもアセトニトリル含量が 10~40%の範囲であれば、各成分は他の成分と良好に分離することが明らかとなった。そこで、測定の夾雑成分等を一分析毎に溶出する目的で、アセトニトリル含量 30%→95%(15 分間)とするグラジエント溶離とした。

さらに、移動相に酢酸アンモニウムを微量添加し MS/MS 部における感度向上について検討した。即ち、移動相に酢酸アンモニウムを 0.1~2 mM となる様に添加し、濃度と各成分の MRM クロマトグラムにおけるピーク面積の関係を調査した。その結果、ほぼ全ての化合物で約 0.5 mM が感度的に至適濃度となることが明らかとなった。そこで、移動相中に酢酸アンモニウムを 0.5 mM となるよう添加することとして、移動相条件を決定した。

最終的に本条件下で再度 MRM 条件について検討し、化合物毎に測定条件を再調整して MS/MS 条件を決定した。これらの条件を Table 1 に示した。

C.1.2 試料前処理法の検討

試料前処理には、固相抽出法を採用した。固相抽出カートリッジは、数種の製品を比較検討した結果、回収率並びに試料液の通りやすさが優れていた GL-Pak PLS2 を採用した。また、溶出溶媒について検討するためビール試料を用いて各化合物の回収率及び夾雑成分等について調査した結果、酢酸エチルにて良好な結果が得られたので、本溶媒を溶出溶媒とした。また、溶媒量は各化合物の回収率から 5 mL とした。

C.1.3 試料の希釈

市販アルコール飲料は、おおよそ 1~40% のアルコールを含量する。そこで、アルコール濃度に応じて、適宜希釈することにより上記の前処理法を適用することを検討した。はじめに 40% までのアルコール溶液を用いて添加回収試験を実施した。その結果、アルコール濃度 30% 未満では、各化合物とも 80% 以上の回収率が得られたが、アルコール濃度が 30% 以上であると回収率が低下した。そこで、試料のアルコール濃度に応じ水で希釈し検討した結果、アルコール濃度 25~40% の試料は 2 倍希釈とすることで良好な回収率が得られることが明らかとなった。この結果から、アルコール濃度 25% 以上の試料では前処理前に 2 倍に希釈を行うこととした。

C.1.4 BADGE 標準溶液の安定性

各化合物の中で最も容易に分解すると推定される BADGE について、メタノール中の安定性を調査した。その結果、加水分解により主に BADGE.H₂O 等を生成し、室温下 10 µg/mL の濃度において、3 日後の

BADGE 残存率は約 94% であることが明らかとなった。また、冷蔵 (4℃) 保管で残存率は約 96% となった。これらの結果から、標準溶液は一回の分析毎に用時調製とすることが望ましいと考えられた。

C.1.5 分析法のバリデーション

本分析法について非蒸留酒で夾雑成分を比較的多く含有するビールを試料として、分析法のバリデーションを行った。

その結果、本法により BPA 及び BADGE 類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。本法による BPA の定量限界は 0.2 ppb であり、繰り返し精度は BPA 0.5 ppb 相当添加試料にて測定し変動係数(cv)で 8% 以内であった。また BADGE.2HCl を除く BADGE 類では、定量限界は 0.5 ppb となり BADGE.2HCl では 2 ppb となった。また、試料溶液の安定性について BADGE 添加試料の測定結果から評価した結果、少なくとも 20℃ 24 時間後では、分析値に有意差は認められず、本条件以内で分析することにより問題はないものと考えられた。

次に、各酒類のカテゴリーから代表的 1 試料を選択し試料として、BPA 及び BADGE 類の添加回収試験を行った。その結果、全ての酒類で BPA の回収率は 90~110% となり、良好であった。一方、BADGE 類では、ウイスキーの回収率がやや低い (40~70%) 結果となった。そこで、このカテゴリーの酒類では、標準添加法により BADGE 類を定量することとした。

C.2 市販製品の試験結果

C.2.1 ビール及び発泡酒