

＜その３＞規格試験法におけるビスフェノール A の定量下限

研究代表者 六鹿 元雄

国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品衛生法では、ポリカーボネート（PC）を主成分とする合成樹脂製の器具・容器包装に対してビスフェノール A（BPA）の規格が設定されている。その規格値は、フェノール及び *p*-tert-ブチルフェノールを含む 3 化合物の溶出量の合算値として 2.5 µg/mL 以下とされており、規格に適合していることを判定するための試験法（以下、告示試験法）も定められている。

現行の溶出量の規格値は、米国国家毒性プログラム（NTP）試験¹⁾から設定された最小毒性量（LOAEL）50 mg/kg 体重/日及び耐容一日摂取量（TDI）0.05 mg/kg 体重/日を根拠として設定されたが、その後、2015 年に欧州食品安全機関（EFSA）は、BPA の低用量影響問題から、TDI を暫定的に 4 µg/kg 体重/日に引き下げ²⁾、プラスチック規則における移行限度値（SML）を 0.05 mg/kg 以下とした³⁾。さらに、2021 年には TDI を 0.04 ng/kg 体重/日とする再評価のドラフト案を公表したが、2023 年に最終的に TDI を 0.2 ng/kg 体重/日と設定した⁴⁾。これに基づき、欧州委員会は食品接触材料に対して BPA（類縁体を含む）の使用を原則禁止とした⁵⁾。一方、米国においても検討が進められているが、結論は出されておらず、ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）は TDI を 0.2 µg/kg 体重/日に設定し⁶⁾、英国毒性委員会（COT）

はこれを支持しており⁷⁾、各国の対応は一致しておらず、食品安全委員会においても BPA の TDI の見直しが検討されている。

現行の BPA の告示試験法は、溶出操作で得られた試験溶液を液体クロマトグラフ（LC）に注入し、試験溶液中の 3 化合物を C18 カラムにより分離後、それらの紫外吸光度を測定して定量するものである。しかし、新たに提示される TDI によっては、現行の規格値が大幅に引き下げられることも予想され、現行の試験法では対応が困難となる可能性がある。そこで試験機関による共同試験を実施し、各試験機関における液体クロマトグラフ-紫外可視吸光度検出器（LC-UV）、液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器（LC-PDA）、液体クロマトグラフ-蛍光検出器（LC-FL）、液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）による定量下限値を推定することにより、検出器ごとに適用可能な BPA 規格値を検証した。

B. 研究方法

1. 共同試験ワーキンググループ

地方衛生研究所、登録検査機関の実務経験者から希望者を募り、「共同試験ワーキンググループ」（表 1）を設置し、共同実験プロトコル及び結果報告シートを作成した。さらに得られた結果の解析方法及び結果についての意見交換を行った。共同試験ワーキンググループの参加者を表 1 に示した。

表 1 共同試験ワーキンググループ参加者

氏名	所属	氏名	所属
阿部 智之	日本食品衛生協会	藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
岩越 景子	東京都健康安全研究センター	片岡 洋平	国立医薬品食品衛生研究所
海野 明広	愛知県衛生研究所	藤原 恒司	国立医薬品食品衛生研究所
風間 貴充	日本食品分析センター	山口 未来	国立医薬品食品衛生研究所
岸 映里	大阪健康安全基盤研究所	六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 環	福岡県保健環境研究所		

2. 試薬・試液

水：オルガノ（株）製超純水装置ピューリック w で精製した超純水

アセトニトリル：LC/MS 用、関東化学株式会社製

BPA：東京化成工業株式会社製

BPA 溶液：BPA 20 mg をアセトニトリルに溶解して 200 mL としたもの

3. 共同試験の実施

共同試験には民間の登録検査機関、公的な衛生研究所など 18 機関が参加した。分析に用いる検出器は 1 機関当たり最大 3 種までとし、LC-UV と LC-PDA の測定は同一機関では行わないよう調整した。参加機関には、国立医薬品食品衛生研究所にて調製した BPA 溶液（100 µg/mL アセトニトリル溶液）を 9 月 3 日または 4 日に配布し、参加機関は「共同実験プロトコル」（別添）に従って、BPA 溶液を 50%アセトニトリルで 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000 ng/mL となるように希釈し、LC-UV、LC-PDA、LC-FL、LC-MS、LC-MS/MS により 10 月 2 日までに測定し、BPA のピーク面積を求め、国立医薬品食品衛生研究所に報告した。

4. 定量下限値の算出

各機関から報告された BPA のピーク面積を用いて、各機関における分析装置ごとの定量下限値を求めた。定量下限値は以下の 2 つの方法で算出した（図 1）。

1) 方法 1

連続する 5 点の濃度点（ $A < B < C < D < E$ ）とそのピーク面積値（ a, b, c, d, e ）について、隣接する濃度点との濃度比及びピーク面積比を求めた。得られた値のすべてが下記の条件を満たすとき、最小濃度点を定量下限値とした。

$$A/B \times 0.90 \leq a/b \leq A/B \times 1.10$$

$$B/C \times 0.90 \leq b/c \leq B/C \times 1.10$$

$$C/D \times 0.90 \leq c/d \leq C/D \times 1.10$$

$$D/E \times 0.90 \leq d/e \leq D/E \times 1.10$$

2) 方法 2

連続する 5 点から作成した検量線の近似式（一次直線）を用い、各濃度点（ $A < B < C < D < E$ ）のピーク面積値（ a, b, c, d, e ）から濃度を逆算した。得られた濃度（ A', B', C', D', E' ）のすべてが下記の条件を満たすとき、最小濃度点を定量下限値とした。

$$A \times 0.90 \leq A' \leq A \times 1.10$$

$$B \times 0.90 \leq B' \leq B \times 1.10$$

$$C \times 0.90 \leq C' \leq C \times 1.10$$

$$D \times 0.90 \leq D' \leq D \times 1.10$$

$$E \times 0.90 \leq E' \leq E \times 1.10$$

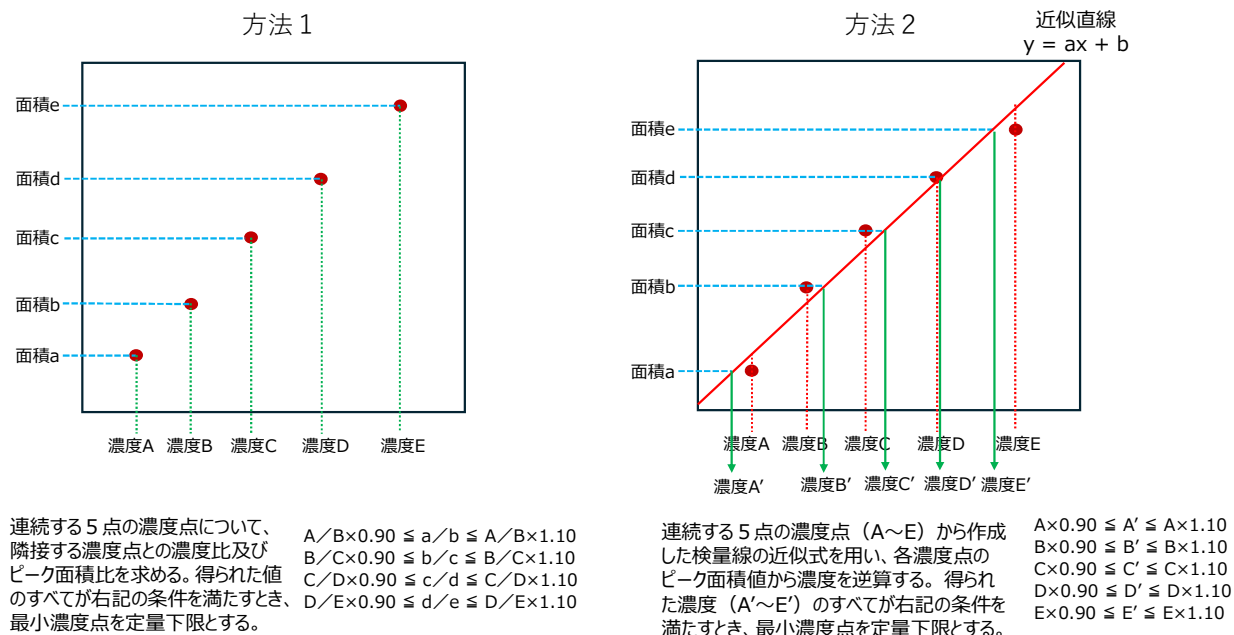


図 1 定量下限値の算出方法

C. 研究結果及び考察

1. 定量下限の算出

規格試験法では定量精度が重要であることから、検量線は近似直線で作成することとした。定量下限値の算出方法として、一般的な試験器具を用いれば BPA は操作ブランクとして検出されないことから検量線は原点付近を通ることを前提とし、連続する2つの濃度点において、ピーク面積の差が明確であり、濃度依存的に増加していることを条件とした

【方法1】、連続する5つの濃度点で作成した検量線が妥当であることを条件とした【方法2】による2つの方法で定量下限値を求めることとした。その際の許容される誤差範囲は、理論値の±10%とした。

2. 現行の試験法における定量下限

現行法で採用されている LC-UV または LC-PDA による測定をそれぞれ6及び8機関で実施した。なお、LC 条件及び BPA の測定波長は現行法に準じた。各機関の定量下限値を表2及び3に示した。溶出規格における規格値は、BPA、フェノール及び *p*-tert-ブチルフェノールの量の合計として 2.5 µg/mL 以下であるのに対し、今回得られた定量下限値は 5~100 ng/mL であり、定量下限値が最も高かった機関 B においても、規格値の 1/25 の濃度まで定量が可能であった。LC-PDA による定量下限値は LC-UV と比べてやや高い傾向がみられたが、いずれの機関においても BPA の溶出量として 100 ng/mL まで定量可能であったことから、BPA に対してのみの溶出量であれば、現行法で 100 ng/mL まで対応可能である。

表2 LC-UVによるBPAの定量下限値 (ng/mL)

機関	A	B	C	D	E	F
測定範囲	5-2000	50-2000	20-2000	5-2000	5-2000	10-1000
方法1	50	100	20	5	5	10
方法2	10	100	20	5	5	20

測定範囲：測定を行った濃度またはピーク面積が得られた濃度

表3 LC-PDAによるBPAの定量下限値 (ng/mL)

機関	G	H	I	J	K	L	M	N
測定範囲	10-2000	20-2000	10-2000	10-2000	50-2000	5-2000	20-2000	1-2000
方法1	10	20	20	20	50	20	50	20
方法2	10	20	20	50	50	20	50	5

測定範囲：測定を行った濃度またはピーク面積が得られた濃度

3. 蛍光検出器による定量下限

BPA、フェノール及び *p*-tert-ブチルフェノールは LC-FL でも検出が可能である。クロマトグラムにおけるピーク形状は対称かつシャープであり、ピークの近傍に定量を著しく妨害するようなピークは見られず、LC-UV で測定した場合よりも、S/Nが10倍以上高感度であることが報告されている⁸⁾。そこで、現行法と同様の分光分析である LC-FL による測定を8機関で実施した。なお、LC 条件は現行法に準じた。FL 検出器の励起波長は230 nm、蛍光波長は316 nmとした。各機関の定量下限値を表4に示した。定量下限値は0.1~10 ng/mL であり、LC-FL による定量下限値は LC-UV または LC-PDA と比べて低く、定量下限値が最も高かった機関 J においても、規格値の 1/250 の濃度まで定量が可能であった。FL 検出器は選択性が高く夾雑物の影響を受けにくいこと、フェノール及び *p*-tert-ブ

チルフェノールも検出可能であることから、LC-FL を用いた方法は、LC-UV または LC-PDA では対応できない低い規格値を設定しようとする場合には、代替法として有用な方法と考えられた。

4. 質量分析計による定量下限

LC-MS または LC-MS/MS を用いた測定を10 または 12 機関で実施した。測定条件については、測定モードとして選択反応モニタリング (SRM または MRM) を用いること以外は任意とした。ただし、カラムは ODS (サイズ、粒径は任意)、移動相は水・アセトニトリル、注入量は 10 µL、イオン化法は ESI (-)、モニターイオンは (MS) *m/z* 227、(MS/MS) *m/z* 227→212 または *m/z* 227→133 の諸条件を参考として提示した。

表4 LC-FLによるBPAの定量下限値 (ng/mL)

機関	A	G	I	J	O	P	Q	R
測定範囲	0.2-2000	1-2000	1-2000	2-2000	0.05-2000	5-2000	0.5-2000	0.1-2000
方法1	2	5	1	10	0.2	5	0.5	0.2
方法2	2	1	1	10	0.1	5	1	0.1

測定範囲：測定を行った濃度またはピーク面積が得られた濃度

各機関の定量下限値を表5及び6に示した。LC-MSによる定量下限値は0.05～5 ng/mLであり、LC-FLの定量下限値と比べてやや低い程度であった。一方、LC-MS/MSによる定量下限値は0.02～1 ng/mLであり、大部分の機関で1 ng/mL以下まで定量可能であった。そのため、LC-MS/MSを用いた方法は、LC-FLでも対応できない低い規格値を設定しようとする場合には、有用な方法と考えられた。一方、質量分析法については、令和元年に行った共同試験ではRSD_r、RSD_Rを満たすことができない場合や真度を満たさない機関が多数あったことから、現状では告示試験法への適用は難しいことが示唆されており⁹⁾、今回の結果においても4機関（C, M, O, Q）で定量下限値が算出できなかった。ただし、今回の共同試験では測定条件を細部まで定めておらず、機関ごとに条件が異なる。そのため、改めてLC-MSまたはLC-MS/MSによる定量下限値を求める際は、測定条件を最適化したうえで、統一した条件で共同試験を実施する必要がある。

5. 規格値に対応した検出器の選択

今後設定されるBPAのTDIによっては、現行の規格値を大幅に下げる必要が生じる。今回推定された各検出器の定量下限値は、試験機関によって20～100倍程度の違いがみられたが、規格値が0.1 µg/mL（現行の規格値の1/25）以上となる場合は、現行法であるUVまたはPDA検出器で対応可能であった。一方、規格値が0.01～0.1 µg/mL（現行の規格値の1/250～1/25）となる場合は、選択性が高く夾雑物の影響を受けにくいFL検出器を用いた方法、規格値が0.001～0.01 µg/mL（現行の規格値の1/2500～1/250）となる場合は、MS/MSを検出器とする方法を規格試験法とすることが望ましいと考えられた。ただし、質量分析法は分光分析法と比べてマトリックスの影響を受けやすいため、夾雑物が多い試験溶液を測定する際は注意が必要であるほか、検量線が二次曲線となった場合は、ピーク面積値が濃度依存的に増加すること、得られるピーク面積値に再現性があることの確認も必要となる。また、規格値が0.001

表5 LC-MSによるBPAの定量下限値 (ng/mL)

機関	C	D	E	L	M
測定範囲	10-500	0.1-2000	0.2-2000	2-2000	50-2000
方法1	-	2	2	2	-
方法2	-	0.5	0.5	2	-
機関	N	O	P	Q	R
測定範囲	0.2-2000	0.2-2000	0.5-2000	2-2000	0.05-100
方法1	5	-	1	5	0.2
方法2	0.5	0.2	2	2	0.05

測定範囲：測定を行った濃度またはピーク面積が得られた濃度

-：定量下限値を設定できない

表6 LC-MS/MSによるBPAの定量下限値 (ng/mL)

機関	A	B	C	D	E	G
測定範囲	0.5-2000	0.001-2000	0.01-10	0.01-2000	0.02-2000	0.001-2000
方法1	2	0.5	0.2	0.05	0.2	1
方法2	0.5	0.1	-	0.05	0.2	0.2
機関	L	M	O	P	Q	R
測定範囲	0.5-2000	0.02-5	0.001-2000	0.01-2000	0.5-2000	0.02-50
方法1	0.5	0.1	-	0.5	0.5	0.02
方法2	0.5	0.1	1	0.05	-	0.05

測定範囲：測定を行った濃度またはピーク面積が得られた濃度

-：定量下限値を設定できない

μg/mL 未満となる場合は、試験溶液の濃縮操作が必要となるが、濃度が低いため、規格試験法として十分な性能を確保できないおそれがあることから、溶出規格としてのリスク管理は困難と考えられる。

D. 結論

今後、BPA の規格値が大幅に引き下げられた場合、現行の試験法では対応が困難となる可能性がある。そこで試験機関による共同試験を実施し、各試験機関における LC-UV、LC-PDA、LC-FL、LC-MS、LC-MS/MS による定量下限値を推定した。その結果、現行法で採用されている LC-UV または LC-PDA における定量下限値は 5～100 ng/mL であり、規格値が 0.1 μg/mL（現行の規格値の 1/25）以上となる場合は、現行の試験法で対応可能であった。LC-FL による定量下限値は 0.1～10 ng/mL であり、規格値が 0.01～0.1 μg/mL（現行の規格値の 1/250～1/25）となる場合は、代替法として有用な方法と考えられた。LC-MS/MS による定量下限値は 0.02～2 ng/mL であり、LC-FL でも対応できない低い規格値を設定しようとする場合には、有用な方法と考えられた。一方、規格値が 0.001 μg/mL 未満となる場合は、十分な性能を確保できる規格試験法の設定が困難と考えられた。

E. 参考文献

- 1) NTP: NTP technical report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6C3F1 mice (1982)
- 2) EFSA: Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary, EFSA Journal 13 3978 (2015)
- 3) EUROPEAN COMMISSION: COMMISSION REGULATION (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials (2018)
- 4) EFSA: Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs, EFSA Journal 21 6857 (2023)
- 5) EUROPEAN COMMISSION: COMMISSION REGULATION (EU) 2024/3190 of 19 December 2024 on the use of bisphenol A (BPA) and other bisphenols and bisphenol derivatives with harmonised classification for specific hazardous properties in certain materials and articles intended to come into contact with food, amending Regulation (EU)

- No 10/2011 and repealing Regulation (EU) 2018/213 (2024)
- 6) BfR: Bisphenol A: BfR proposes health based guidance value, current exposure data are needed for a full risk assessment, BfR Opinion No 018/2023 (2023)
- 7) Committee on Toxicity HP, Bisphenol A (BPA): Additional information, COT Meeting: 12th December 2023, TOX/2023/62, [https://cot.food.gov.uk/Bisphenol%20A%20\(BPA\):%20Additional%20information](https://cot.food.gov.uk/Bisphenol%20A%20(BPA):%20Additional%20information)
- 8) 片岡洋平, 六鹿元雄, 阿部裕, 近藤翠, 四柳道代, 佐藤恭子: ポリカーボネート製器具・容器包装の溶出試験におけるビスフェノール A 分析法の改良, *食品衛生学雑誌*, **64**, 111-115 (2023)
- 9) 片岡洋平, 四柳道代, 阿部裕, 六鹿元雄: 器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる分析法の検討, 令和元年度厚生労働科学研究 食品用器具・容器包装等の安全性確保に資する研究 分担報告書 (2020)