

LC/MSを用いた東京都民の食事からのビスフェノールA一日摂取量調査

新藤 哲也^a, 貞升 友紀^a, 鈴木 敬子^a, 田中 康一^a, 外川 明子^a, 植松 洋子^a

ビスフェノールA (BPA) はヒトへの内分泌かく乱作用を示す可能性があることが懸念されている。今回、2010年および2011年の東京都民の食品からのBPA一日摂取量を調査した。東京都内にある地元の小売店から購入した食品を、2010年および2011年の「東京都民の健康・栄養状況」における「食品群別にみた食品摂取量」により14の食品群に分類し、それぞれのグループごとの食品を通常の食形態に合わせて生のままあるいは調理加工を行い、それらを混合、ホモジナイズし、分析に供した。

14グループに分類した食品試料中のBPAの定量分析はLC/MSを用いて行った。LC/MSの分析条件は以下のとおりとした。カラム: Cosmosil 5C₁₈-MS-II, 移動相: アセトニトリル・0.01%酢酸 (4:6), キャピラリー電圧: 3.0kV, コーン電圧: 44V, デソルベーション温度: 500°C, コリジョンエネルギー: 17eV, MRM測定: m/z 227→212。

各群の食品に添加したBPAの回収率はいずれも70%以上, C.V.値11%以下であった。また, 検出限界は4, 5, 10, 11, 13群が2 ng/gであり, それ以外の群は1.0 ng/gであった。今回の調査では2010年および2011年のいずれもすべての群からビスフェノールAは検出されなかった。

キーワード: ビスフェノールA, 一日摂取量, LC/MS, マーケットバスケット方式, 食品

はじめに

ビスフェノールA (以下BPAと略す) は, ポリカーボネート製のプラスチックを製造する際のモノマーや, エポキシ樹脂の原料として使用されている。我が国ではBPAは内分泌かく乱化学物質として環境庁よりリストアップされた67物質の一つであり, 特に子供や次世代への影響が懸念されている¹⁻³⁾。2008年にカナダではBPAを人体と環境にとって有害な物質と規定し, BPAに制限を加える政策をとった⁴⁾。デンマークでは0~3歳児用の食品容器へのBPAの使用を禁止する等, 乳幼児への健康影響について関心が高まっている⁵⁾。

人がBPAを摂取する主な経路は食品であると思われるが, 欧州食品安全機関 (EFSA)⁶⁾で缶詰食品からBPAが検出された事例が報告されているように容器や缶詰食品の内面コーティングに使用されているBPAが食品へ溶出することによると考えられる。このため, 食品由来のBPAの摂取量を調査することは, 人体への影響を知る上で重要である。これまで, BPAの各種食品中における含有量の報告は多数あり⁷⁻¹⁵⁾, 東京都でも平成13年にマーケットバスケット方式によるビスフェノールAの一日摂取量調査について宮川ら¹⁶⁾が報告している。その際, 3群砂糖・菓子類および10群魚類から微量のビスフェノールAが検出されている。

BPAの分析方法はこれまでGC/MSを用いた方法^{7,10,11,14,16)}が一般的であったが, 最近では簡便なLC/MSを用いた方法^{9,12,15)}が多く用いられている。

そこで, 今回著者らはLC/MSによる分析法を用いて, 改めてマーケットバスケット方式によって食品を購入し,

各食品について実際の食形態に基づいた調理加工を行った上で試料調製を行い, 東京都民のビスフェノールA一日摂取量を調査したので報告する。

実験方法

1. 試料

1) 食品群の分類

2010年および2011年いずれも410品目の食品を, 5月から6月にかけて, 都内のスーパーマーケットおよび小売店より購入した。試料は「平成20年東京都民の健康・栄養状況」¹⁷⁾および「平成21年東京都民の健康・栄養状況」¹⁸⁾における「食品群別にみた食品摂取量」に基づき, 1群: 米・米加工品, 2群: 米以外の穀類・種実類・芋類, 3群: 砂糖・甘味料類・菓子類, 4群: 油脂類, 5群: 豆・豆加工品, 6群: 果実類, 7群: 緑黄色野菜類, 8群: その他の野菜・茸類・海草類, 9群: 調味料・嗜好品, 10群: 魚介類, 11群: 肉類・卵類, 12群: 乳・乳製品, 13群: その他の食品 (カレールー, シチュールー等), および14群: 飲料水の計14食品群に分類した (Table 1)。

2) 作製

2010年は「平成20年東京都民の健康・栄養状況」¹⁷⁾, 2011年は「平成21年東京都民の健康・栄養状況」¹⁸⁾における「食品群別にみた食品摂取量」に基づき, 試料作製に必要な食品摂取量を決定した。

各食品はその可食部について実際の食形態に従い, 米は炊飯し, それ以外の食品はそのまま用いるか, または茹でる, 焼く等の調理を行った後, 食品群毎にステンレスミ

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

Table 1. Food Groups of Total Diet Study Samples

Food Group	Number of Foods	
	2010	2011
1 Rice and rice products	11	11
2 Cereals, nuts and potatoes	38	38
3 Sugar and confectionery	32	32
4 Fats and oils	15	15
5 Beans	25	25
6 Fruits	20	19 ^{*1}
7 Colored vegetables	21	21
8 Vegetables, mushrooms and seaweed	40	40
9 Spices and preference beverages	41	41
10 Fish, seafoods and fish products	86	86
11 Meat, eggs and meat products	47	47
12 Milk and milk products	19	20 ^{*2}
13 Other foods (curry sauce <i>etc</i>)	14	14
14 Drinking water	1	1
total	410	410

*1: strawberry was excluded

*2: goat milk was added

キサーで粉碎混合，均一化して分析試料とした．飲料水は都内の一般家庭飲料水を30分以上放水後採取して試料とした．なお，各試料は分析まで -20°C で保存した．

2. 標準品および試薬

1) 標準品

BPAおよびBPA- d_{16} は関東化学(株)製のいずれも環境分析用を用いた．

2) 固相抽出カートリッジ

Oasis HLB VAC 60 mg (BPAフリー水用)，Oasis HLB 30 mg (試験溶液の調製用) いずれもWaters社製を用いた．

3) BPAフリー水

ミリポア(株)製ミリQ水製造装置により製造された水をOasis HLB VAC 60 mgで2回処理したものをを用いた．

4) 添加用標準溶液

標準品各10 mgを正確に量り，アセトンを加えて正確に25 mLとし，添加用混合標準原液とした(本液1 mLはBPA400 mgおよびBPA- d_{16} 400 mgを含む)．これをアセトンで段階的に希釈し，50 ng/mL添加用混合標準溶液とした(本液1 mLはBPA50 ngおよびBPA- d_{16} 50 ngを含む)．

5) 検量線用標準溶液

標準品各10 mgを正確に量り，アセトニトリルを加えて正確に25 mLとし，検量線用混合標準原液とした(本液1 mLはBPA400 mgおよびBPA- d_{16} 400 mgを含む)．これをアセトニトリルで段階的に希釈し，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液とした．さらに1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液を0.5, 1, 2 mLそれぞれ正確に採り，アセトニトリル・BPAフリー水(4:6)溶液で正確に20 mLとし，検量線用標準溶液(添加回収試験用)とした(これらの液1 mLはBPAおよびBPA- d_{16} を各25, 50, 100 ngを含む)．また，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液2 mLを正

確に採り，アセトニトリル・BPAフリー水(4:6)溶液で正確に20 mLとし，100 ng/mL混合標準溶液とした．さらにこれを1, 2, 4 mL正確に採り，それぞれアセトニトリル・BPAフリー水(4:6)溶液で正確に20 mLとし，検量線用標準溶液(試料測定用)とした(これらの液1 mLはBPAおよびBPA- d_{16} を各5, 10, 20 ngを含む)．

アセトニトリル，エタノール，石油エーテルおよび酢酸エチルはいずれも和光純薬工業(株)製の残留農薬・PCB試験用5000をBPAフリー水以外の水は和光純薬工業(株)製の蒸留水(ヘキサン洗浄品)を用いた．

3. 装置

LC/MS: Waters社製のACQUITY UPLC/TQDを用いた．

4. 試料への添加方法

50 ng/mL添加用混合標準溶液1 mLを分析毎に各試料へ添加後，水浴 60°C で30分間加熱してアセトンを除去し，分析に供した．なお，試料当たりの添加量は10 ng/g (4, 5, 10, 11, 13群は25 ng/g)，いずれも $n=3$ とした．

5. 試験溶液の調製

佐二木らの方法¹²⁾に準拠して行った (Fig. 1)．調製試料5 g (4, 5, 10, 11, 13群は2 g)を50 mL遠沈管に秤取し，これにアセトニトリル15 mLを加え1分間ホモジナイズした．遠心分離(3,000 rpm, 10分間, 10°C)後，上清を200 mL共栓付メスシリンダーに分取した．さらに残渣にアセトニトリル10 mLを加え同様に操作した後，上清を合わせた．これに水140 mLを加え，あらかじめエタノール5 mLおよび水5 mLでそれぞれコンディショニングした固相抽出カートリッジ(Oasis HLB 30mg)に負荷した．15%エタ

ノール5 mL, 水5 mL, 石油エーテル10 mLで順次洗浄した後, 酢酸エチル5 mLで溶出した. これを約0.5 mLまで40°Cで減圧濃縮後, 窒素気流下(室温)で乾固した. 残留物にアセトニトリル・BPAフリー水(4:6)溶液1 mLを加えて溶解した後, 0.20 μ mのフィルターでろ過し, LC/MS用試験溶液とした.

Sample 5 g (IV, V, X, XI, XIII: 2 g)

Extract with 15 mL of acetonitrile (2 nd time, 10 mL)	} 2 times
Homogenize for 1 min	
Centrifuge (3,000 rpm, 10 min, 10°C)	

All of extracted solution

Add 140 mL of water

Oasis HLB (30 mg)

(Conditioned with each 5 mL of ethanol and water)
Wash the column with 5 mL of 15% ethanol, followed by 5 mL of water and 10 mL of petroleum ether
Elute with 5 mL of ethyl acetate

Eluate

Reduce the volume to 0.5 mL by evaporation in vacuo at 40°C
Dry under N ₂ stream at room temperature

Residue

Redissolve in 1 mL of acetonitrile・water (4:6)
Filtrate through 0.22 μ m filter

LC/MS

Fig. 1. Analytical Procedure of Bisphenol A in Foods

6. LC/MS条件

カラム: Cosmosil 5C₁₈-MS-II 2.0 mm i.d.×150 mm (粒径 5 μ m) ナカライテスク(株)製, 移動相: アセトニトリル・0.01%酢酸(4:6), 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 μ L, イオン化法: ESI(-), キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 44 V, コリジョンエネルギー: 17 eV, イオン源温度: 130°C, デソルベーション温度: 500°C, コーンガス流量: 50 L/hr, 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, 測定モード: MRM (m/z 227→212 定量用), MRM (m/z 227→133 確認用)

結果及び考察

1. 分析法の検討

1) LC/MS条件

はじめに移動相の検討を行った. 佐二木らは移動相にアセトニトリル・水(4:6)を使用している¹²⁾. 一方, 堀江らはアセトニトリル・水系の移動相に少量の酢酸を加えることで, 感度が約2倍になることを報告している⁹⁾. そこで, アセトニトリル・水系の移動相に少量の酢酸またはギ酸を添加して検討した. その結果, 酢酸を添加した場合には感度が高くなり, ギ酸を添加すると感度は低下した. さらに種々検討したところ, アセトニトリル・0.01%酢酸

(4:6)を用いた場合が最も感度が良好で, 分析時間も10分以内であった.

次にMS条件として, キャピラリー電圧, コーン電圧, デソルベーション温度, コリジョンエネルギーの検討を行った. はじめにキャピラリー電圧1.5 kV, コーン電圧40 V, デソルベーション温度400°C, その他の条件は6. LC/MS条件のとおりとし, スキャンモード(m/z 40~300)で測定を行った. その結果, Fig. 2に示すようにBPAは m/z 227, m/z 212, BPA-*d*₁₆は m/z 241, m/z 223に主なピークが検出された. そこで, BPAのSIM条件について検討するため, m/z 227の感度が最大となるようにコーン電圧を20~80 Vの範囲で分析したところ, コーン電圧44 Vで最大となった. また, コーン電圧を44 Vに固定し, キャピラリー電圧を1.0~3.0 V, デソルベーション温度を300~500°Cまで変化させて感度を調べたところ, キャピラリー電圧3.0 kV, デソルベーション温度500°Cでそれぞれ最大となった. これらの結果から, MS条件は, キャピラリー電圧3.0 V, コーン電圧44 V, デソルベーション温度500°Cとした.

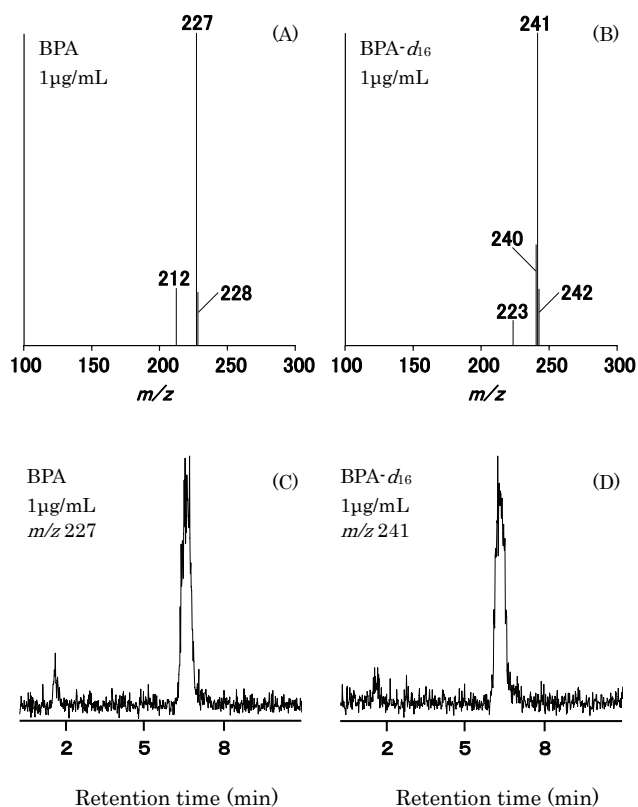


Fig. 2. MS Spectra (Scan) and MS Chromatograms of BPA (A, C) and BPA-*d*₁₆ (B, D)

Cone voltage: BPA, 44V; BPA-*d*₁₆, 46V

さらに, この条件でMRM条件を検討するため, コリジョンエネルギーを10~80 Vの範囲でドータースキャンを行ったところ, コリジョンエネルギー17 eVで m/z 212の感度が最大となり, これとは別に m/z 133が観測されたため, コリジョンエネルギーを17 eVとし, m/z 212を定量用, m/z 133を確認用とした (Fig. 3). 同様にBPA-*d*₁₆について検討

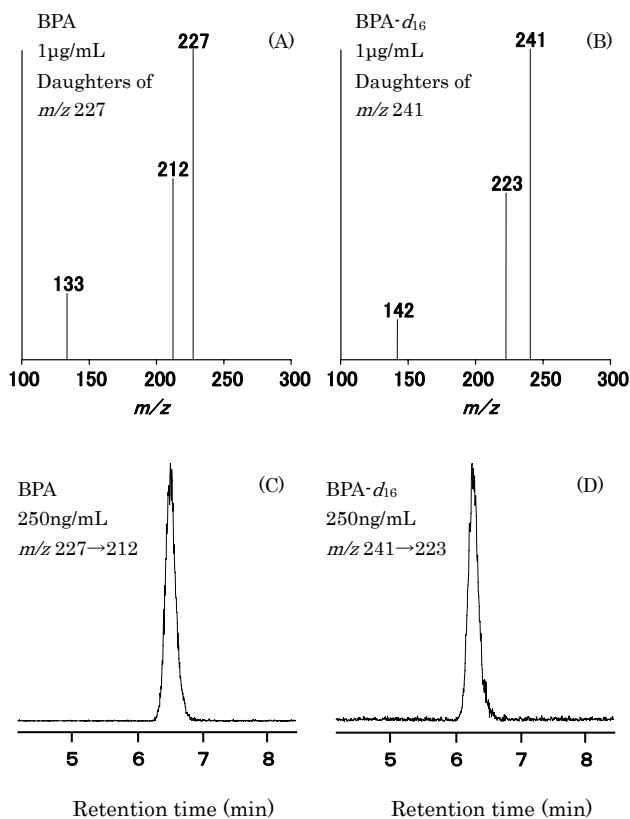


Fig.3. MS Spectra (Daughters) and MRM Chromatograms of BPA (A, C) and BPA- d_{16} (B, D)

Collision energy : BPA 17eV, BPA- d_{16} 20eV

し、キャピラリー電圧3.0 kV, コーン電圧46 V, デソルベーション温度500°C, コリジョンエネルギー20 eV (m/z 223) と決定し, 以下, BPAとBPA- d_{16} を決定した条件で同時分析することとした。

なお, 試料についてBPAおよびBPA- d_{16} のSIMによる測定を試みたが, 各群とも妨害物質の影響が大きく, 定量が困難であった。そこで, MRMによる測定を行ったところ, 妨害物質がほとんどなかったことから, 以下の測定はすべ

てMRMで行うこととした。

2) 試験溶液の調製

試料からのビスフェノールAの抽出にあたっては, 佐二木らの方法¹²⁾を用いて検討したが, 以下の操作について若干の変更を加えた。遠心分離後の水の添加量について, 120 mLではカラム負荷の段階でビスフェノールAが一部溶出してしまうことがわかった。そこで, 水の添加量を140 mLにしたところ, 良好な回収率が得られた。また, 濃縮操作についてエバポレーターによる減圧濃縮を試みたが, 濃縮乾固するとビスフェノールAが一部揮散により減少することがわかったため, 約0.5 mLまで減圧濃縮した後, 窒素気流下で濃縮乾固することとした。

2. 添加回収試験

BPAおよびBPA- d_{16} の添加回収試験の結果をTable 2に示した。BPAは70%以上, C.V.値11%以下と良好な回収率が得られ, BPA- d_{16} についても各群ともBPAとほぼ同様な回収率およびC.V.値を示した。これらのBPA回収率はサロゲートであるBPA- d_{16} による補正は行わなかった。

なお, 添加回収試験を行った後, 試料の分析を行う場合は, 添加回収試験で添加したBPAが残留することにより, 検出される場合があった。そこで, 器具類, エバポレーターや固相抽出装置等をできる限り添加用と試料用で専用にするBPAの検出が抑えられることがわかった。

3. 摂取量調査

2010年, 2011年について, 1~13群のBPA含有量調査をn=3で行った結果, すべての群からBPAは検出されなかった (Table 3)。3, 6群および4, 13群の試験溶液におけるMSクロマトグラムをFig. 4およびFig. 5に示した。いずれも妨害ピークはみられず良好なクロマトグラムが得られた。なお, 本法における検出限界は1.0 ng/g (4, 5, 10, 11, 13群は2 ng/g) であった。東京都では2003年に宮川らが同

Table 2. Recoveries of BPA and BPA- d_{16} Spiked to Total Diet Study Samples

	Food Group	BPA		BPA- d_{16}	
		Recovery	C.V.	Recovery	C.V.
1	Rice and rice products	82.7	4.5	82.1	6.6
2	Cereals, nuts and potatoes	88.3	5.5	90.0	4.9
3	Sugar and confectionery	84.3	4.2	83.7	3.1
4	Fats and oils*	83.8	3.8	76.6	2.3
5	Beans*	73.5	6.7	61.9	6.2
6	Fruits	87.8	2.0	82.8	2.7
7	Colored vegetables	71.2	8.1	68.1	8.3
8	Vegetables, mushrooms and seaweed	87.9	8.8	82.2	4.9
9	Spices and preference beverages	83.0	10.8	86.9	5.3
10	Fish, seafoods and fish products*	85.3	6.2	74.8	10.7
11	Meat, eggs and meat products*	87.8	6.4	83.2	3.5
12	Milk and milk products	80.4	4.2	78.3	10.6
13	Other foods (curry sauce etc)*	70.0	4.7	64.7	9.1
14	Drinking water	81.9	9.9	79.8	10.4

spiked level: 10 ng/g (*: 25 ng/g)

(%, n=3)

様の調査を行い, 3群(砂糖・菓子類)から2.0 ng/gのBPAを検出している¹⁶⁾. また, EFSA⁹⁾によると缶詰食品から, 日本で<10~95 ng/g (2001), イギリスで9~91 ng/g (2004), ニューゼーランドで<10~191 ng/g (2005) のBPAが検出されたとされているが, 今回の調査でBPAが検出されなかったことから, BPAを含まない容器や内面コーティングを施した缶等への移行が進んだものと考えられた.

まとめ

2010年および2011年の「東京都民の健康・栄養状況」における「食品群別にみた食品摂取量」に基づき, 食品を14群に分類し, 実際の食形態に合わせて加工調理した試料について, 東京都民のBPA一日摂取量調査を行った.

BPAの分析法はLC/MSを用いた方法を検討し, LC条件としてカラムにCosmosil 5C₁₈-MS-II, 移動相にアセトニトリル・0.01%酢酸 (4:6), MS条件としてキャピラリー電圧3.0 kV, コーン電圧44 V, デソルベーション温度500°C, コリジョンエネルギー17 eV, MRM (*m/z* 227→212) で分析することとした.

本法におけるBPAの添加回収率は各群とも70%以上, C.V.値11%以下で, 検出限界は1.0 ng/g (4, 5, 10, 11, 13群は2 ng/g) であった.

各食品群中のBPA含有量を調べた結果, 2010年および2011年のいずれもすべての群からビスフェノールAは検出されなかった.

Table 3. Contents of BPA in Total Diet Study Samples

Food Group		BPA Content (ng/g)
1	Rice and rice products	ND
2	Cereals, nuts and potatoes	ND
3	Sugar and confectionery	ND
4	Fats and oils	ND*
5	Beans	ND*
6	Fruits	ND
7	Colored vegetables	ND
8	Vegetables, mushrooms and seaweed	ND
9	Spices and preference beverages	ND
10	Fish, seafoods and fish products	ND*
11	Meat, eggs and meat products	ND*
12	Milk and milk products	ND
13	Other foods (curry sauce <i>etc</i>)	ND*
14	Drinking water	ND
ND<1.0 ng/g (*<2.0 ng/g)		(n=3)

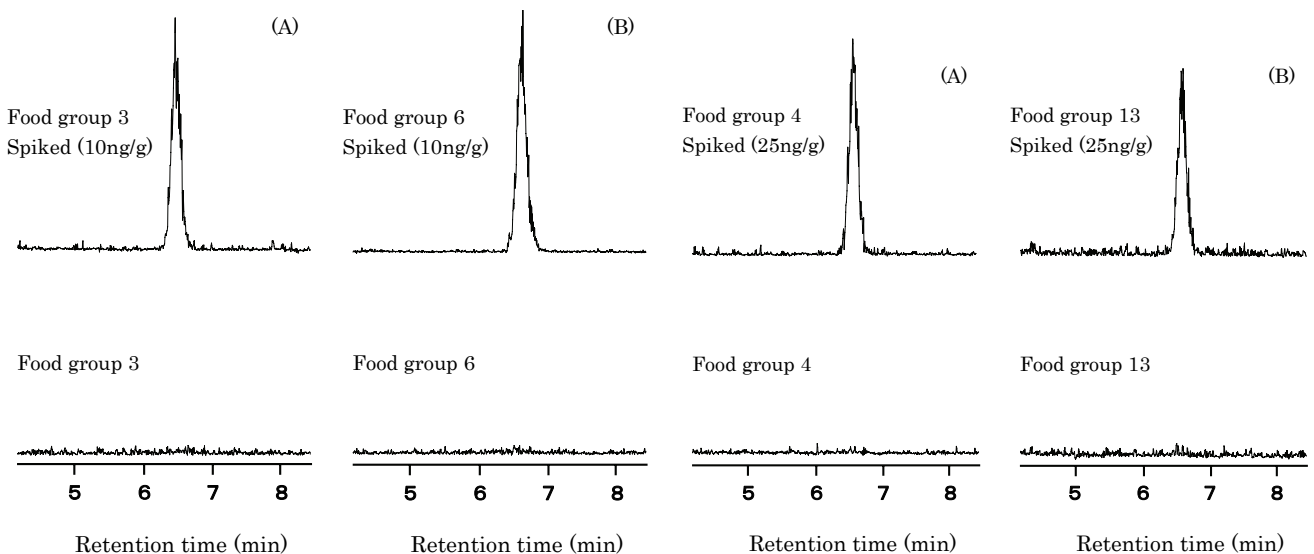


Fig.4. MRM Chromatograms of BPA spiked to Food Group 3 (A) and 6 (B)
m/z 227→212

Fig.5. MRM Chromatograms of BPA spiked to Food Group 4 (A) and 13 (B)
m/z 227→212

(本調査は東京都福祉保健局化学物質保健対策分科会で
行った「平成22年度 食事由来の化学物質摂取量推計調査」
および「平成23年度 食事由来の化学物質摂取量推計調査」
の一環として行った。)

文 献

- 1) Dodds, E. C., Lawson, W.: *Proc. Roy. Soc. B*, **125**, 222-232, 1938.
- 2) Krishnan, A. V., Stathis, P., Permut, S. F., Tokens, L., Feldman, D.: *Endocrinology*, **132**, 2279-2286, 1993.
- 3) Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M., Welshons, W. V.: *Environ. Health Perspect.*, **105**, 70-76, 1997.
- 4) Health Risk assessment of Bisphenol A from Food Packaging Applications: *Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch*, 1-14, 2008.
- 5) Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A: *EFSA journal*, **8**, 1829, 2010.
- 6) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE(Bisphenol A): *EFSA journal*, **428**, 1-75, 2006.
- 7) 河村葉子, 佐野比呂美, 山田 隆: 食衛誌, **40**, 158-165, 1999.
- 8) 瀧野昭彦, 津田泰三, 小嶋美穂子, 他: 食衛誌, **40**, 325-333, 1999.
- 9) 堀江正一, 吉田栄充, 石井里枝, 他: 分析化学, **48**, 579-587, 1999.
- 10) 今中雅章, 佐々木久美子, 根本 了, 他: 食衛誌, **42**, 71-78, 2001.
- 11) 宮川弘之, 金子令子, 鎌田国広: 東京健安研セ年報, **57**, 231-233, 2006.
- 12) Sajiki, J., Miyamoto, F., Fukata, H. et al.: *Food Additives and Contaminants*, **24**, 103-112, 2007.
- 13) Judy, S. L., Daniel, Q. N.: *J. of Exposure Sci. and Environmental Epidemiology*, **18**, 608-615, 2008.
- 14) Mariscal-Arcas, M., Rivas, A., Granada, A. et al.: *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 506-510, 2009.
- 15) Luke, K. A., Gregory, O. N., Wendy, M. H.: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 2307-2313, 2010.
- 16) 宮川弘之, 嶋村保洋, 鈴木敬子, 他: 東京健安研セ年報, **55**, 157-161, 2004.
- 17) 東京都福祉保健局: 東京都民の健康・栄養状況(平成20年国民健康・栄養調査 東京都・特別区・八王子市実施分集計結果) 平成22年8月.
- 18) 東京都福祉保健局: 東京都民の健康・栄養状況(平成21年国民健康・栄養調査 東京都・特別区・八王子市実施分集計結果) 平成23年8月.

Survey on Dairy Intake of Bisphenol A by Tokyo Residents Using LC/MS

Tetsuya SHINDO^a, Yuki SADAMASU^a, Keiko SUZUKI^a, Yasukazu TANAKA^a,
Akiko TOGAWA^a, and Yoko UEMATSU^a

There has been concern that bisphenol A (BPA) might be an endocrine disruptor for human beings. Hence, the daily intake of BPA from food was surveyed in Tokyo residents in 2010 and 2011. Foods purchased from local retail stores in Tokyo were classified into 14 groups according to “The Daily Food Group Intake” in *The Health and Nutrition Conditions of Tokyo Residents 2010 and 2011*, cooked or left uncooked to prepare regular diets, combined according to each group, and homogenized to create samples for analysis.

Quantitative determination of BPA in the 14 food sample groups was carried out using liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS). The LC/MS analytical conditions were as follows: analytical column, COSMOSIL 5C18-MS-II; mobile phase, acetonitrile–0.01% acetic acid (4:6), capillary voltage, 3.0 kV; cone voltage, 44 V; desolvation temperature, 500°C; collision energy, 17 eV; MRM measurement, m/z 227→212.

Recoveries of BPA spiked to each group’s sample exceeded 70%, and the coefficients of variation (CV%) were below 11%. The detection limits of BPA were 2.0 ng/g for groups IV, V, X, XI, and XIII, and 1.0 ng/g for the rest. BPA was detected in none of the 14 groups in 2010 and 2011.

Keywords: bisphenol A, daily intake, LC/MS, market basket, food

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan