

GC/MSによる一日摂取量調査試料中のビスフェノールAの分析

宮川 弘之^{*}, 嶋村 保洋^{**}, 鈴木 敬子^{**},
井部 明広^{***}, 斎藤 和夫^{*}

Determination of Bisphenol A in Total Diet Study Samples by GC/MS

Hiroyuki MIYAKAWA^{*}, Yasuhiro SHIMAMURA^{**}, Keiko SUZUKI^{**},
Akihiro IBE^{***} and Kazuo SAITO^{*}

A method for the determination of bisphenol A (4,4-isopropylidene diphenol) in total diet study samples by GC/MS was developed, and bisphenol A was determined in these samples. In case of low protein samples, bisphenol A was extracted with acetonitrile from samples, and the extract was defatted, then cleaned up on a GL-Pak PLS-2 cartridge and a Sep-Pak NH₂ cartridge. After that, bisphenol A was derivatized with BSTFA and determined by GC/MS. In case of high protein samples, bisphenol A was extracted with acetone, and the extract was defatted, concentrated, then water was added and re-extracted with diethyl ether. The diethyl ether extract was cleaned up on a GL-Pak PLS-2 cartridge and afterwards handled as above. The detection limit was 1.0 ng/g. Each of the thirteen groups of adult type and child type total diet study samples was analyzed by this method. As a result, 2.9 ng/g of bisphenol A was detected in the sugar and confectionery group of adult type samples, and 2.0 ng/g of bisphenol A was detected in same group of child type samples. Daily dietary intakes of bisphenol A estimated by this results were lower than 0.1 percent of provisional tolerable daily intake proposed by Scientific Committee on Food, EU.

Keywords: ビスフェノール A bisphenol A, 一日摂取量 daily intake, ガスクロマトグラフ/質量分析計 GC/MS

緒 言

合成樹脂の原料や安定剤として広汎に用いられているビスフェノール A(4,4'-isopropylidene diphenol, 以下 BPA と略す)は, 内分泌かく乱作用を有することが疑われており^{1,2)}, 特に子供や次世代への影響が懸念されている。

人が BPA を摂取する主な経路は食品であると考えられ, 食品由来の BPA の摂取量を調査することは, 子供をはじめ人体への影響を知る上で重要である。しかし, BPA の各種食品中における含有量の報告はあるものの³⁻⁹⁾, 実際に食品を経由してヒトが一日にどのくらいの BPA 量を摂取しているかは不明である。

食事由来の各種化学物質の摂取量を調査する方法の一つにマーケットバスケット方式による一日摂取量調査がある。今回, 東京都では子供への有害性が疑われる化学物質の食事からの暴露量調査を実施するため, マーケットバスケット方式によるそれらの化学物質の一日摂取量調査を行った。

そこで著者らは, 一日摂取量調査試料中の BPA のガスクロマトグラフ/質量分析計(以下 GC/MS と略す)による分析法を検討し, その方法を用いて分析を行ったところ若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料 平成 13 年国民栄養調査結果における, 東京都民の栄養状況による食品群別摂取量により, 2 歳から 6 歳までの食事の平均モデルを作成し幼児食とした。また, 全年齢層の平均モデルを成人食とした。これらのモデルに基づいて, 幼児食は 207 品目, 成人食は 228 品目の食品を都内で購入し, 通常の食事形態に従いそのまま又は調理後, 食品群ごとにまとめてホモジナイズし 13 食品群のトータルダイエット試料とした(Table 1)。なお, 調理の際に使用するまな板は木製のものを用い, 調理に用いた水は超純水製造装置で製造された超純水を, 調理後のホモジナイズ時

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 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

*** 東京都健康安全研究センター食品化学部

Table 1. The Contents List of Samples

No.	Food group	Examples
1	Rice/Processed rice	Rice/Rice vermicelli
2	Cereal except rice	Wheat flour/Bread
3	Sugar/Confectionery	Sugar/Cookies/Jam
4	Fat/Oil	Soybean oil/Mayonnaise
5	Pulse	Soybean curd/Miso
6	Fruit	Apple/Orange/Grape
7	Green, yellow vegetable	Spinach/Carrot/Pumpkin
8	Other vegetable/Algae	Japanese radish/Onion/Wakame
9	Beverage/Seasoning	Beer/Soy-sauce/Green tea
10	Fish/Shellfish	Mackerel/Octopus/Shrimp
11	Meat/Egg	Beef/Pork/Hen's egg
12	Milk/Dairy product	Cow milk/Yogurt
13	Other food	Curry powder

に加えた水は、2. 試薬の項に記載した水を用いた。

2. 試薬 BPA 標準品：和光純薬工業（株）製 環境分析用ビスフェノール A 標準品 純度 99.0 % 以上；BPA 標準原液：BPA をジクロロメタンに溶解し 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した；BPA d_{16} 標準品：関東化学（株）製環境分析用ビスフェノール A- d_{16} 純度 99.9 %；BPA d_{16} 標準原液：BPA d_{16} をジクロロメタンに溶解し 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した；検量線用混合標準溶液：BPA 標準原液と BPA d_{16} 標準原液を等量混合後ジクロロメタンで希釈し 2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製したものをさらに希釈して用いた；サロゲート物質溶液：BPA d_{16} の標準原液をメタノールで希釈し 1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した；*p*-ターフェニル d_{14} ：アルドリッチ社製 *p*-Terphenyl- d_{14} ；内部標準溶液：*p*-ターフェニル d_{14} をジクロロメタンに溶解し 1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した；水：日本ミリポア（株）製超純水製造装置で製造したミリ Q 水を同社製 EDS ポリッシャーにより精製し、BPA が検出されないことを確認して用いた；N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド（BSTFA）：ジエールサイエンス（株）製 ガスクロマトグラフ用；GL-Pak PLS-2 カートリッジ：ジエールサイエンス（株）製 GL-Pak PLS-2 (270 mg/6 mL) を使用直前に酢酸エチル 5 mL，メタノール 5 mL，水 5 mL で順次洗浄して用いた；Sep-Pak NH₂ カートリッジ：Waters 社製 Sep-Pak Vak を使用直前にアセトン 5 mL，メタノール 5 mL，クロロホルム 5 mL で順次洗浄して用いた；その他の試薬：いずれも残留農薬試験用を用いた。

3. 装置 GC/MS：(株)島津製作所製 GC17/QP-5000

4. GC/MS の測定条件 カラム：HP 社製 HP-5 (0.25 mm i.d. \times 30 m，膜厚 0.25 μm)；カラム温度：50 (1 min) - 20 /min - 200 - 10 /min - 280 (3 min)；注入口温度：250；インターフェース温度：275；キャリアガス：

He；線速度：35.6 cm/s；注入方法：スプリットレス；注入量：2 μL ；イオン化電圧：70 eV (EI モード)；測定モード：SIM；SIM 条件：定量用イオン $m/z = 244$ (*p*-ターフェニル d_{14}) 357 (BPA) 368 (BPA d_{16})，定性用イオン $m/z = 372$ (BPA) 386 (BPA d_{16})

5. GC/MS 用試験溶液の調製 操作を Fig. 1 に示した。

結果及び考察

1. GC/MS 測定 キャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーでは、絶対検量線法で正確な定量値を得ることは難しいため、内部標準法を用いることにした。内部標準物質としては、BPA と化学構造が類似していること、保持時間が近いこと、不純物として考えられる BPA の混入を避けるため重水素体であることが必要なことから、*p*-ターフェニル d_{14} を用いることにした。また、今回は多種類の試料を低濃度まで測定するため、サロゲート物質として BPA d_{16} を用い、試料ごとに回収率を確認し、測定結果は回収率で補正することにした。

2. 試験溶液調製法の検討 試験溶液の調製は前報¹⁰⁾に準じて行ったが、今回の試料は固形あるいは半固形状のため、試料にアセトニトリルを加えホモジナイズして抽出した。抽出液をヘキサンで脱脂した後、減圧濃縮し、得られた抽出物を水で溶解し GL-Pak PLS-2 へ負荷して固相抽出処理を行った。その後、前報と同様に Sep-Pak NH₂ を用いてクリーンアップし、今回は測定装置に GC/MS を用いることから、BPA の揮発性を高めるために BSTFA によりトリメチルシリル化を行った。

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12 群の試料では以上の方法により分析が可能であったが、5, 10, 11 群の高たんぱく質の試料及び 13 群では良好な回収率が得られなかった。そこでさらに精製法を検討した。

高たんぱく質試料では、今中らの方法⁸⁾で用いられてい

[Food group No.1,2,3,4,6,7,8,9,12]	[Food group No.5,10,11]	[Food group No.13]
Sample 10 g BPA d ₁₆ 100 ng homogenize with acetonitrile (50, 40 mL) centrifuge 3,000 rpm for 5 min	Sample 10 g BPA d ₁₆ 100 ng homogenize with acetone (50, 30, 30 mL) centrifuge 3,000 rpm for 5 min	Sample 5 g BPA d ₁₆ 50 ng add 30 mL of acetonitrile and 30 mL of hexan melt in 60 °C water bath shake for 5 min centrifuge 3,000 rpm for 5 min
Supernate defat with 50 mL of hexan add 10 mL of 1-propanol concentrate in vacuo add 30 mL of water	Supernate add 10 mL of 1-propanol concentrate in vacuo add 50 mL of water defat with 50 mL of hexan extract with diethyl ether (30 mL, × 3)	Acetonitrile layer defat with 30 mL of hexan add 5 mL of 1-propanol concentrate in vacuo add 30 mL of water
	Diethyl ether layer concentrate in vacuo add 30 mL of water	
	transfer to GL-Pak PLS-2 cartridge* wash with 10 mL of water pass air for 10 minutes elute with 4 mL of ethyl acetate	
	Ethyl acetate layer evaporate to dryness	
	Residue dissolve in 1 mL of ethyl acetate add 10 mL of chloroform transfer to Sep-Pak NH ₂ cartridge** wash with 5 mL of chloroform elute with 5 mL of acetone	
	Eluate evaporate to dryness	
	Residue dissolve in 500 μL of dichloromethane add 200 μL of BSTFA stand for 1 hour at room temp. add 100 μL of internal standard solution	
	GC/MS	

* conditioned with 5 mL of ethyl acetate, 5 mL of methanol and 5 mL of water

** conditioned with 5 mL of acetone, 5 mL of methanol and 5 mL of chloroform

Fig. 1. Analytical Procedure for Bisphenol A (BPA) in Total Diet Study Samples

るアセトンを抽出溶媒として検討した。まず試料にアセトンを加えホモジナイズを行い抽出し、減圧濃縮後、水を加えてヘキサンで脱脂した。さらに液-液分配によりジエチルエーテルで抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮した後、抽出物を水で溶解し GL-Pak PLS-2 に負荷し、固相抽出処理を行った。以下前記と同様に操作したところ良好な回収率が得られた。

13 群はカレールー、ハヤシルーであり固形油脂分が多く、ホモジナイズは困難だった。そこで、アセトニトリルとヘキサンを加え温浴上で溶解後、振とう抽出した。遠心分離後、アセトニトリル層を減圧濃縮し得られた抽出物を水で溶解して GL-Pak PLS-2 に負荷し、以下前記と同様に操作したところ良好な回収率が得られた。

一連の分析では、水 10 mL を用いて試料と同様に操作し、操作ブランクから BPA が検出されないことを確認した。

3. 検量線 BPA 標準原液と BPA d₁₆ 標準原液を等量混合、

ジクロロメタンで段階的に希釈した。トリメチルシリル化後、内部標準溶液を一定量加え、内部標準法により検量線を作成した。その結果、20 ~ 2000 ng/mL の範囲で直線性を示した ($r=0.999$)。

4. 添加回収実験 成人食の各食品群に BPA および BPA d₁₆ をそれぞれ 10 ng/g の濃度になるように添加後、本法に従って操作し回収率を求めた。Table 2 に示したように、BPA、BPA d₁₆ とほぼ 70 % 以上の良好な回収率が得られ、両者は各群においてほぼ同じ回収率を示したことから、BPA d₁₆ をサロゲート物質として BPA の含有量を求めることにした。なお、8 群は 7 群と同じ野菜であるので添加回収実験を省略した。

本法による検出限界を S/N=3 の濃度として求めたところ、試料当り 1.0 ng/g であった。

本法を用いて得られた 7 群と 10 群のクロマトグラムを Fig. 2, Fig. 3 に示した。他のいずれの試料も同様に、妨

Table 2. Recoveries of BPA and BPA d₁₆ from Spiked Samples

No.	Food group	Recovery ^{a)} (mean±SD %)	
		BPA	BPA d ₁₆
1	Rice/Processed rice	82.2± 1.7	81.1± 1.7
2	Cereal except rice	97.0± 1.6	97.0± 2.7
3	Sugar/Confectionery	81.4± 2.3	88.5± 2.9
4	Fat/Oil	70.5± 5.4	69.6± 6.4
5	Pulse	86.7± 4.2	79.3± 7.5
6	Fruit	87.9± 0.9	82.1± 3.2
7	Green, yellow vegetable	78.3± 4.3	81.3± 2.8
9	Beverage/Seasoning	88.0± 3.8	89.7± 2.4
10	Fish/Shellfish	69.9±13.6	66.8±11.3
11	Meat/Egg	75.2± 7.2	69.8± 5.0
12	Milk/Dairy product	92.7± 1.3	88.6± 5.4
13	Other food	74.0± 8.3	75.4± 2.1

a) 10 ng/g of BPA was spiked to each sample. Results of 3 trials.

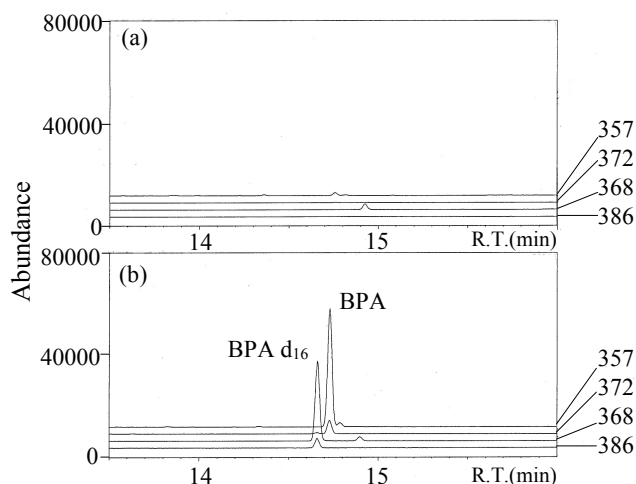


Fig. 2. SIM Chromatograms of Group No.7 (Green, Yellow Vegetable)
(a)control blank (b)spiked with 10 ng/g of BPA and BPA d₁₆

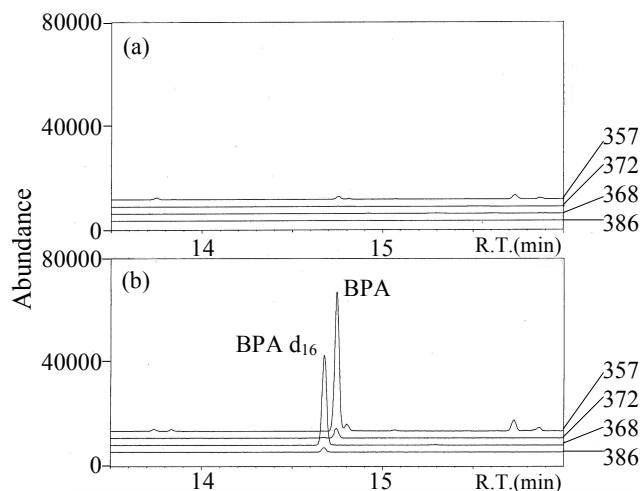


Fig. 3. SIM Chromatograms of Group No.10 (Fish, Shellfish)
(a)control blank (b)spiked with 10 ng/g of BPA and BPA d₁₆

害の無い良好なクロマトグラムが得られた。

5. 一日摂取量調査試料中の BPA 含有量 本法を用いて 1 ~ 13 群の幼児食と成人食の一日摂取量調査試料合計 26 検体中の BPA 含有量を測定し,その結果を Table 3 に示した。

全 26 検体中 3 群を除く 24 検体では BPA は検出限界以下であったが,3 群の幼児食から 2.0 ng/g,成人食から 2.9 ng/g の BPA が検出された。

3 群は砂糖・菓子類であり,砂糖,はちみつ,ジャム,餅,和菓子,せんべい,ケーキ,ビスケット,チョコレート,ゼリーが含まれる。

各食品ごとに分析は行わなかったため,BPA の検出原因

となった食品は判らなかったが,輸入はちみつはドラム缶に詰めて輸入されるため,ドラム缶内側にコーティングされたエポキシ樹脂からののはちみつへの汚染の可能性が考えられた。

今回 3 群から検出された BPA 濃度を用いて,BPA の一日摂取量を求めたところ,幼児では 4.75 ng/kgbw/day,成人では 1.95 ng/kgbw/day と計算された。欧州連合(EU)の食品科学委員会(SCF)は,BPA の耐用一日摂取量(TDI)として,暫定的に 10 μg/kgbw/day を算出した。今回の調査結果に基づいて計算から得られた BPA の一日摂取量は,幼児,成人ともこの暫定 TDI の 1000 分の 1 以下であり,毒性的に特に問題とはならないレベルと考える。

Table 3. Contents of BPA in Total Diet Study Samples

No.	Food group	Content of BPA(ng/g)	
		Adult	Child
1	Rice/Processed rice	ND ^{a)}	ND
2	Cereal except rice	ND	ND
3	Sugar/Confectionery	2.9	2.0
4	Fat/Oil	ND	ND
5	Pulse	ND	ND
6	Fruit	ND	ND
7	Green, yellow vegetable	ND	ND
8	Other vegetable/Algae	ND	ND
9	Beverage/Seasoning	ND	ND
10	Fish/Shellfish	ND	ND
11	Meat/Egg	ND	ND
12	Milk/Dairy product	ND	ND
13	Other food	ND	ND

a)ND: <1.0ng/g

また、仮に第3群以外のすべての群に、BPAが検出限界以下である0.9 ng/g含まれていると仮定すると、BPAの一日摂取量は、幼児では74.10 ng/kgbw/day、成人では38.03 ng/kgbw/dayとなる。これらの値は暫定TDIの100分の1以下であり、毒性的に特に問題とはならないレベルと考える。

ま と め

一日摂取量調査試料中のBPAのGC/MSによる分析法を検討し、試料を測定した。

高たんぱく質試料以外では、試料をアセトニトリルで抽出し、脱脂、さらにGL-Pak PLS-2カートリッジとSep-Pak NH₂カートリッジによりクリーンアップを行い、BSTFAでトリメチルシリル化後GC/MSで分析することができた。

高たんぱく質試料では、試料をアセトンで抽出し、脱脂、濃縮後、水を加え液-液分配によりジエチルエーテルで抽出、GL-Pak PLS-2カートリッジによりクリーンアップした後、

前記と同様に操作した。

検出限界は、1.0 ng/gであった。

本法を用いて1~13群の成人食、幼児食の一日摂取量調査用試料合計26検体を分析したところ、成人食の3群から2.9 ng/g、幼児食の3群から2.0 ng/gのBPAが検出された。この結果から、BPAの一日摂取量を求めたところ、成人では1.95 ng/bwkg/day、幼児では4.75 ng/kgbw/dayとなり、EUの食品科学委員会(SCF)で提唱されている暫定TDI 10 µg/kgbw/dayの1000分の1以下だった。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第85回学術講演会2003年5月で発表した。)

文 献

- 1) Nagel, S.C., von Saal, F.S., Thayer, K.A., *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **105**, 70-76, 1997.
- 2) von Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., *et al.* : *Toxicology and Industrial Health*, **14**, 239-260, 1998.
- 3) Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **103**, 608-612, 1995.
- 4) Biles, J.E., McNeal, T.P., Begly, T.H. : *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4697-4700, 1997.
- 5) 河村葉子, 佐野比呂美, 山田隆 : 食衛誌, **40**, 158-165, 1999.
- 6) 堀江正一, 吉田栄充, 石井里枝, 他 : 分析化学, **48**, 579-587, 1999.
- 7) 瀧野昭彦, 津田泰三, 小嶋美穂子, 他 : 食衛誌, **40**, 325-333, 1999.
- 8) 今中雅章, 佐々木久美子, 根本了, 他 : 食衛誌, **42**, 71-78, 2001.
- 9) 高畑薫, 植田晶子, 渡辺四男也, 他 : 日食工誌, **48**, 437-443, 2001.
- 10) 宮川弘之, 井部明広, 田端節子, 他 : 東京衛研年報, **52**, 66-72, 2001.