

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

缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出に関する研究

分担研究者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 缶コーティングから飲料へのビスフェノールAの溶出に関連する各種ファクターの影響及び溶出原因の解明を行うため、缶入飲料の調査でビスフェノールA含有量が高かったコーヒー及び紅茶各2銘柄の相当缶及びその改良缶を試験した。缶各部位のコーティング中のビスフェノールA含有量を測定したところ、コーヒーAではサイドシーム、コーヒーBと紅茶Bでは底部で極めて高い含有量を示した。また、紅茶Aでは突出した部位はみられなかったが、面積が広い側面の含有量がやや高いため、缶全体では高い値を示した。一方、改良缶では、側面及び底部はほぼ定量限界以下であり、サイドシームも大きく減少していた。

これらの缶について食品擬似溶媒を用いた溶出試験を行ったところ、水60℃及び95℃30分間、20%エタノール60℃30分間、*n*-ヘプタン25℃60分間のいずれの条件においてもビスフェノールAの溶出はみられなかった。しかし、水120℃30分間で溶出を行うと、相当缶では35~124 ng/mLの溶出がみられ、缶入飲料におけるビスフェノールAにほぼ近い値であった。また、溶出時間の増加とともに溶出量の増加がみられた。これらのことから、ビスフェノールAの溶出には、エポキシ樹脂のガラス転移温度である104℃以上の加熱が必要であり、飲料を缶に封入後の加圧加熱滅菌における温度と時間が、溶出に大きく影響することが示唆された。一方、改良缶では溶出量は3~6 ng/mLと大幅に減少しており、缶コーティング中の残存量を減少させた今回の改良は、ビスフェノールAの溶出量低減に極めて有効であったと判断された。

次に、ビスフェノールA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、その四水酸化体(BADGE-40H)及び二塩素体(BADGE-2Cl)について、LC/MSによる飲料中の分析法を開発し、市販缶入飲料72検体中の含有量を分析した。ビスフェノールAは、紅茶、緑茶等の茶飲料から検出されたが清涼飲料及び酒類では検出されず、前回の調査と比べて高い含有量のものがなくなり、検出頻度、含有量ともに減少していた。一方、BADGE関連化合物については、BADGEはいずれの試料からも検出されなかったが、その加水分解物であるBADGE-40Hは、紅茶、緑茶など茶飲料を中心に、スポーツ飲料、果汁飲料、リカー類からも検出され、残存量もビスフェノールAより数倍~数十倍高かった。さらに、塩化水素付加体のBADGE-2Clもポリ塩化ビニル樹脂塗装缶の一部飲料から検出された。BADGE関連化合物については、EUの暫定基準値1 ppmを超える試料はみられなかったが、今後注視していく必要があると考える。

A. 研究目的

食品用の缶は、その内面をエポキシ樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂などでコーティングされている。エポキシ樹脂は原料がビスフェノールAであり、ポリ塩化ビニル樹脂は安定剤としてビスフェノールAを添加することから、コーティング中に遊離のビスフェノールAが存在しており、それらが缶内容物に移行することが知られている。我々はこれまで、コーヒー、紅茶、茶等の缶入飲料にビスフェノールAが多く残存することを明らかにしてきた。これらの加圧加熱殺菌処理が行われている缶入飲料は我が国で開発されたものであり、我が国における消費量は極めて高いが、欧米ではあまり普及していない。そのため、我が国におけるビスフェノールA摂取量においては、他の国々と比較して特異的に、缶入飲料からの摂取の寄与率が高いことが予想される。しかし、缶コーティングからのビスフェノールA溶出のメカニズムや各種ファクターの影響等については、まだ十分に明らかにされておらず、低減化にむけての方策を検討しておく必要があると考えられる。

また、ビスフェノールAのエポキシ化体で、エポキシ樹脂の原料であり、塩化ビニル樹脂の安定剤であるビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、及びその分解物等の関連化合物の中にも内分泌攪乱が疑われるものがあり、缶入飲料への溶出が懸念されるが、それらに関する報告はほとんどみられない。

そこで、缶コーティングから飲料へのビスフェノールAの溶出及びそれに影響を与えるファクター及び移行原因の解明を行い、さらに缶入飲料中のビスフェノールA及び関連化合物の分析法を開発し、市販缶入飲料中のこれらの化合物の残存量を調査することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1) 試料

① モデル缶：缶入飲料の調査においてビスフェノールA含有量が高かったコーヒーA及びB、紅茶A及びBに相当する未使用缶、及びその改良缶

② 市販缶入飲料：紅茶19検体、緑茶12検体、健康茶5検体、玄米茶4検体、ウーロン茶3検体、スポーツ飲料6検体、果汁飲料6検体、炭酸飲料2検体、ビール8検体、リカー類7検体の合計72検体、1999年10～11月に都内の小売店または自動販売機で購入した。

2) 試薬

標準品：ビスフェノールA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE) 以上東京化成工業製、

ビスフェノールAビス(2,3-ヒドロキシプロピル)エーテル(ビスフェノールA四水酸化体、BADGE-40H)、ビスフェノールAビス-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル)-エーテル(ビスフェノールA二塩素体、BADGE-2Cl) 以上Fluka社製

水：MILLI-Q SP(Millipore社製)により製造した超純水

ポリスチレン固相カートリッジ：GL-Pak PLS-2、ジーエルサイエンス製

フィルター：サンプレップLCR13-LH(直径13 mm, 孔径 0.5 μ m) Millipore社製

3) 装置

フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)：JIR-3505 日本電子データム社製

高感度反射測定装置：IR-RSC 110 日本電子データム社製

高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ポンプ LC-10AD、紫外可視分光検出器 SPD-10AVvp、蛍光検出器 RF-10Ax1、オートインジェクタ SIL-10Ax1、システムコントローラ SCL-10A、データ処理装置 CR-7A plus 以上(株)島津製

作所製

高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS) : HP-1100 series LC/MSD Hewlett Packard製

4) 測定条件

① FT-IR(高感度反射測定装置付)

入射角及び反射角 : 30°

分解能 : 4 cm⁻¹

積算回数 : 100回

波数領域 : 250~4200 cm⁻¹

② HPLC/UV/FL

カラム : TSKgel ODS-80Ts (内径4.6 mm、長さ25 cm、粒径5 μm) 東ソー製

ガードカラム : ステンレスカラム (内径1.0 mm、長さ4.5 cm) にWhatman社製ODSゲルを充填したもの

カラム温度 : 50℃、流量 : 1.0 mL/min

移動相 : アセトニトリル-水 (6:4) から、リニアグラジエント10分間でアセトニトリル100%とし、20分間保持。

UV検出器 検出波長 : 217 nm

蛍光検出器 励起波長 : 275 nm

蛍光波長 : 300 nm

注入量 : 10 μL

③ LC/MS

カラム、ガードカラム及びカラム温度 : HPLC/UV/FLに同じ

流量 : 0.4 mL/min、注入量 : 30 μL

移動相 : 50 mM酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (6:4) から、リニアグラジエント10分間で (5:95) とし、15分間保持。

イオン化法 : エレクトロスプレー (ESI)、ネガティブ (Nega) またはポジティブ (Posi)

ネブライザー : N₂ (Nega 30, Posi 50 psi)

乾燥ガス : N₂ (10 L/min, 350℃)

フラグメンター電圧 : Nega 100 V、Posi 50 V

測定モード : SIM (Nega m/z 227, Posi

m/z 358, 399, 435)

但し化合物の確認には以下の条件を用いた。

フラグメンター電圧 : Nega 140 V、Posi 80 Vまたは100 V

測定モード : SIM (Nega m/z 211, Posi m/z 191, 209, 227)

5) 材質判別

缶の天蓋部、側面部、底蓋部、サイドシームの4つの部位から試験片を切り取り、高感度反射測定装置付FT-IRに装着した。内表面の赤外吸収スペクトルを測定した後、標準品スペクトルとの比較により材質を判別した。

6) 材質試験

缶を天蓋部、側面部、底蓋部、サイドシームの4部位にわけ、それぞれの内面の2×2 cm(サイドシームは1×4 cm)の範囲のコーティングをナイフで削り取った。ジクロロメタン5 mLを加えて、30分間超音波をかけ、1000 rpmで10分間遠心分離後、上清を減圧濃縮した。アセトニトリルに溶解してフィルターでろ過し、HPLC/UV/FLによりビスフェノールAを測定した。

7) 溶出試験

天蓋、底蓋ともに巻き締めた空缶を、サイドシームが下にくるように横に倒して置き、上方に穴を開けて内容量の溶出溶媒を注入した後、アルミホイルで上部を覆い、溶出試験を行った。溶出溶媒として水を用いた場合には、60℃及び95℃30分間、120℃10、30、60分間、20%エタノールを用いた場合には60℃30分間溶出試験を行った。溶出液は液量を缶の内容量に調整し試験溶液とした。*n*-ヘプタンを用いた場合には、25℃1時間溶出試験を行った後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、アセトニトリルに溶解して試験溶液とした。試験溶液はHPLC/UV/FLによりビスフェノールAを測定した。

8) 缶入飲料の試験法

ポリスチレン固相抽出用カートリッジを吸引マニホールドに装着し、アセトニトリル5 mL、次に水5 mLでコンディショニングし、試料50 mLを負荷した。水10 mLで洗浄後、10分間吸引を続けてカートリッジを風乾した。アセトニトリル10 mLで溶離した後、溶離液を10 mLにメスアップし、必要な場合は遠心分離を行い、フィルターろ過をして試験溶液とした。試験溶液は、LC/MSによりビスフェノールA、BADGE、BADGE-40H、BADGE-2Clを測定した。

C. 研究結果

1) 缶入飲料中のビスフェノールA含有量

市販缶入飲料の調査において、表1に示すように、コーヒー飲料では13検体中11検体から検出され平均41.3 ng/mL、紅茶飲料では9検体中4検体で平均19.8 ng/mL、茶飲料では8検体中5検体で6.6 ng/mL、アルコール飲料では10検体中1検体で平均1.3 ng/mLのビスフェノールAが検出されたが、清涼飲料では検出されなかった。このように、飲料の種類によりビスフェノールAの含有量に大きな差がみられ、コーヒー飲料で検出頻度、含有量とも最も高く、ついで紅茶であった。

そのうち、含有量の最も高かったコーヒー、紅茶各2銘柄の飲料中の濃度は、コーヒーA 134 ng/mL、コーヒーB 213 ng/mL、紅茶A 53 ng/mL、紅茶B 90 ng/mLであった(表2)。

ビスフェノールA含有量の高いコーヒー紅茶、茶飲料は、飲料を缶に封入したのち加圧加熱滅菌が行われることから、その影響が推定された。

一方で、同じ種類の飲料でも含有量には大きな差がみられ、これらの差は缶内面コーティングの材質及びそのビスフェノールA含有量に由来することが推定された。

2) モデル缶の材質試験及び溶出試験

そこで、ビスフェノールA含有量の高かった前述の4銘柄の缶入飲料について、缶製造者よりこれらの飲料缶に相当する缶(相当缶)及びその改良缶の提供を受け、材質試験及び溶出試験を行い、含有量が高かった原因の解明、及び溶出に影響を与える各種因子について検討を行った。

① 材質判別

これらの缶の天蓋部、側面部、底蓋部、サイドシームの各部位について、内面コーティングの材質をFT-IRの吸収スペクトルにより判別した。表3に示すように、相当缶の材質は、いずれも天蓋部がポリ塩化ビニル樹脂、底蓋部及びサイドシームがエポキシ樹脂であり、側面部はコーヒー2種はPET、紅茶2種はエポキシ樹脂であった。一方、改良缶では天蓋部がエポキシ樹脂に変更されていたが、それ以外の部位には変更はみられなかった。

② 材質試験

次に、缶の各部位材質中のビスフェノールA含有量を測定した(表4)。コーヒーAはサイドシーム、コーヒーB及び紅茶Bは底蓋部で1000 ng/cm²程度の高いビスフェノールA含有量を示し、紅茶Bではサイドシームも高めの値を示した。また、紅茶Aでは突出した部位はみられなかったが、側面の含量がやや高いため、缶全体の含有量としては高くなった。一方、改良缶では、ビスフェノールA含有量は側面、底蓋部についてはほぼ定量限界以下であった。ただし、サイドシームについては、残存量が高かったコーヒーAでは大幅に低下していたが、コーヒーBではほとんど変わっておらず、すべての製品で数十ng/cm²の残存がみられた。

③ 溶出試験

これらの缶を用いて、食品衛生法に準じて食品擬似溶媒による溶出試験を行った。その

結果、水60℃及び95℃30分間、20%エタノール60℃30分間、*n*-ヘプタン25℃60分間のいずれの条件においても、ビスフェノールAの溶出はみられなかった(表5)。

しかし、表6に示すように、水120℃30分間で溶出を行うと、相当缶では35~124 ng/mLの溶出がみられ、缶入飲料におけるビスフェノールA含有量にほぼ近い溶出量を示した。また、溶出時間10分間及び60分間で試験を行い、溶出量を比較したところ、時間の増加とともに溶出量の増加がみられた。一方、改良缶では3~6 ng/mLと溶出量は大幅に低減していた。

3) 市販缶入飲料中のビスフェノールA、BADGE及び関連化合物の含有量

① 飲料中のビスフェノールA、BADGE及び関連化合物の分析法の検討

ビスフェノールA、BADGE、BADGE-40H及びBADGE-2Clの分析法として、上述のモデル缶の材質及び溶出試験で用いたHPLC/UV/FLによる測定法を検討したところ、標準品の分析では検出感度、直線性ともに良好であったが、飲料抽出物では夾雑物による妨害ピークがみられ、分析できなかった。

そこで、化合物の選択性が高く、しかもマススペクトルにより確認も行えるLC/MSによる分析法の検討を行った。

その結果、HPLCの条件としては、HPLC/UV/FLと同一カラムを用い、移動相に酢酸アンモニウムを50 mM添加し、流速を0.4 mL/minとすることにより、良好な分離及びピーク形状を得ることが出来た。

MSの条件としては、イオン化法としてESI法とAPCI法を検討したが、ESI法の方が検出感度がすぐれていた。また、ビスフェノールAはネガティブモードで、BADGE関連化合物はポジティブモードで良好なピークを得るこ

とができた。BADGE、BADGE-40H、BADGE-2Clのマススペクトルを図1~3に示した。

定量には選択性と検出感度にすぐれたSIMモードとし、フラグメンター電圧をビスフェノールAは100 V、BADGE関連化合物は50 Vとした。また、定量用フラグメントイオンとして、ビスフェノールAはm/z 227([M-H]⁻)、BADGEはm/z 358([M+NH₄]⁺)、BADGE-40Hはm/z 399([M+Na]⁺)、BADGE-2Clはm/z 435([M+Na+H]⁺)を用いた。

また、検出されたピークの確認には、ビスフェノールAはフラグメンター電圧を140 Vとしてフラグメントイオンのm/z 211、BADGEは80 Vとしてm/z 191、BADGE-40Hは100 Vとしてm/z 209を用いた。また、BADGE-2Clは塩素を2個含むため、同位体ピークがm/z +2、+4に出現することを用いて確認した。

標準溶液を用いて検量線を作成したところ、いずれの化合物も1.0~1000 ng/mLまで直線性を示した。

試験溶液の調製は、飲料中のビスフェノールAの分析法に準じ、ポリスチレン固相カートリッジを用いて試料負荷後、水で洗浄し、アセトニトリルで溶出させ、メスアップ、フィルターろ過を行い試験溶液とした。

水、茶、紅茶、スポーツ飲料、炭酸飲料、果汁飲料、ビールに、ビスフェノールA、BADGE、BADGE-40H、BADGE-2Clを各200 ng/mLになるように添加し、回収試験を行った。その結果、74.0~107.2%と良好な回収率が得られた(表7)。

一方、コーヒーについては、夾雑ピークの影響でビスフェノールAの定量限界が100 ng/mLと高く、またBADGE関連化合物の回収率も低かった。そこで、コーヒー飲料については、今回分析を行わず、さらに検討することとした。

② 市販缶入飲料の分析

紅茶、茶、清涼飲料、酒類など市販缶入飲料72検体について、LC/MSによりビスフェノールA、BADGE、BADGE-40H及びBADGE-2Clを測定した(表8~11)。

ビスフェノールAは紅茶で19検体中4検体から2.4~14.2 ng/mL、緑茶で12検体中3検体から3.2~5.6 ng/mL、その他の茶類は12検体中8検体から2.0~22.9 ng/mL検出されたが、清涼飲料及び酒類からは検出されなかった。

一方、BADGE関連化合物のうちBADGEはいずれの試料からも検出されなかったが、BADGE-40Hは、紅茶では19検体中11検体から2.0~191.7 ng/mL、緑茶では12検体中7検体から5.6~240.5 ng/mLなど茶飲料の約2/3から検出され、スポーツ飲料、果汁飲料、リカーからも検出された。また、残存量もビスフェノールAより数倍~数十倍高かった。

さらに、BADGE-2Clがスポーツ飲料、果汁飲料、リカー類各1検体から4.8~23.1ng/mL検出された。これらの飲料の缶内面コーティングは、天蓋部または側面がポリ塩化ビニル塗装であった。

D. 考 察

1) 飲料へのビスフェノールAの移行要因

市販缶入飲料の調査においてビスフェノールA含有量の高かったコーヒー、紅茶各2検体の相当缶について材質試験を行った結果、コーヒーAはサイドシーム、コーヒーB及び紅茶Bは底蓋部で1000 ng/cm²程度の高いビスフェノールA含有量を示し、紅茶Bではサイドシームも高めの値を示した。また、紅茶Aでは突出した部位はみられなかったが、側面の含有量がやや高いため、缶全体の含有量として高かった。

溶出試験の水120℃30分間の溶出量は、缶

あたりの総量を計算すると、それぞれ15.6、23.0、11.9及び32.3 μgとなり、材質中の残存量とほぼ一致する。このことから、飲料への溶出は缶コーティングに残存していたビスフェノールA量に依存しており、加圧加熱等によりエポキシ樹脂が分解して新たにビスフェノールAが生成しているとは考え難い。

ビスフェノールAの含有量の高い部位や残存量は銘柄ごとに異なったが、これは内面塗装に用いた塗料中のビスフェノールA残存量の違い及び塗装後の焼成条件によって異なるものと推定される。

改良缶において、側面や底蓋部はビスフェノールA含有量がほぼ定量限界あたりまで低下しているが、サイドシームではそれらより高い残存がみられる。サイドシームは、側面を巻き締めてから塗布され、またやや厚みが必要であることから、他の部位よりも低減化が容易ではないと推察される。

これらの缶を用いた溶出試験において、溶出温度が100℃未満のいずれの溶媒においてもビスフェノールAの溶出はみられず、一方、水120℃ではすべて溶出がみられたことから、ビスフェノールAの溶出にはエポキシ樹脂のガラス転移温度である104℃以上に加熱されることが必須と考えられた。また、120℃では溶出時間が長いほど溶出も増加していた。

このことから、飲料の種類によって、ビスフェノールA含有量に差異がみられるのは、飲料を缶に封入したのちの加圧加熱滅菌処理の有無及びその滅菌温度及び時間に依存していることが裏付けられた。

相当缶の120℃30分間の溶出量は、飲料中の含有量とほぼ相関がみられるが、飲料中の方がやや高い。これは、市販飲料では、缶が密封状態で加熱滅菌されることから缶内の圧力は大幅に上昇し、より溶出しやすい状態をつくるためと考えられる。それでも、120℃

30分間の水を用いた溶出試験により、飲料への溶出量を予測し、製品を管理することは十分に可能であることが示された。

改良缶における120℃30分間の水を用いた溶出試験では、溶出量は3~6 ng/mLと大幅に減少しており、缶コーティング中のビスフェノールA残存量を減少させた今回の改良は有効であると判断された。

2) 市販缶入飲料中のビスフェノールA、BADGE及び関連化合物の含有量

ビスフェノールAについては、前回の調査と比較して、高い含有量の試料がみられなくなり、検出頻度、含有量ともに低下の傾向を示した。

一方、飲料中のBADGE関連化合物については、BADGEの残存はみられないが、その加水分解物であるBADGE-40Hが極めて広範に残存していることが判明した。これはBADGEが水に対して不安定であるため、缶コーティングから飲料中に溶出してすぐに加水分解を受けて消失し、BADGE-40Hを生成したためと推定される。

BADGE-40Hの含有量は2.0~240.5 ng/mLとビスフェノールAの数倍~数十倍であり、ビスフェノールAを含有する試料ではすべて検出されたが、ビスフェノールAとBADGE-40Hの含有量に必ずしも相関はみられなかった。

また、BADGE-2Clは3検体から4.8~23.1 ng/mL検出されたが、これらの飲料缶は天蓋部または側面がポリ塩化ビニルで塗装されており、塗装加熱時にポリ塩化ビニルから遊離した塩素とBADGEが反応してBADGE-2Clが生成し、飲料中に移行したものと推定された。

E. 結 論

缶入飲料中のビスフェノールA含有量は、缶のサイドシーム、底蓋部、側面のコーティング中のビスフェノールA残存量、及び飲料の滅菌温度や時間に大きく依存しており、材質中の残存量を低減することで溶出量は大きく低減されることが示された。

また、市販缶入飲料中のビスフェノールA含有量は減少傾向にあるが、BADGE関連化合物については、BADGE-40HがビスフェノールAの数倍~数十倍の含有量で広範囲に検出され、また、BADGE-2Clも天蓋部または側面がポリ塩化ビニル塗装の試料から検出された。これらのBADGE関連化合物は、EUにおいて合計の溶出量が暫定的に1 ppm以下と定められており、今回の調査では基準値を超えるものはみられなかったが、数分の1程度の試料もあり、今後注視していく必要がある。

F. 研究業績

①学会発表

井之上浩一、中澤裕之、河村葉子、山田 隆：LC/MSによる缶入水性食品中のビスフェノールA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル及びその関連化合物の分析、日本薬学会第120年会（2000.3）

②論文等

河村葉子、佐野比呂美、山田 隆：缶コーティングから飲料へのビスフェノールAの移行、食衛誌、40、158~165（1999）