

平成 12 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

缶ビール中のビスフェノール A に関する研究

-LC/MS/MS 法による分析法開発と缶ビール・缶体・塗料試料の分析-

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究協力者 池田 満雄、渋谷 一郎、奈良部 雄、表 雅之、林 優子

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/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いたビール中のビスフェノール A 分析法を開発した。本法により各種製品ビールについてビスフェノール A の含有量を調査した結果、主要市販缶ビールからビスフェノール A は検出されなかった。また、国内で流通するビール用アルミ缶について一定条件（120、30 分間）で溶出試験を行い、使用された缶内面塗料とビスフェノール A 溶出量に関して調査した。その結果ビスフェノール A 溶出量は、缶内面塗料に残留するビスフェノール A 量に依存する傾向があることが明らかとなった。

#### A．研究目的

ビール用アルミ缶の内面塗装には、エポキシ樹脂塗料が使用されており、ビスフェノール A(BPA)が中身ビールに移行する可能性が指摘されている。本研究では液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いて、信頼性の高い BPA 分析法を開発することを目的とした。さらに、この方法を用いて全国各地でサンプリングした、市販缶ビールについて試験を実施し BPA 含有量を調べた。また、主要な製缶メーカー 4 社の製造したビール用缶体について、一定条件（120、30 分間）で溶出試験を行い、BPA 溶出量と使用された缶内面塗料の関係について調査した。

#### B．研究方法

#### B.1 試薬・試料

抽出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；関東化学製)、アセトニトリル(HPLC 用試薬；関東化学製)、塩酸(特級試薬；関東化学製)を用いた。また、精製水(蒸留水；Milli-Q、HPLC 用；関東化学、住友精密工業製)を使用した。

標準品として BPA 及び BPA-d<sub>16</sub>(環境分析用試薬；関東化学製)を使用し、各々をエタノールに溶解して 10 µg/mL の標準溶液を調製し、適宜希釈して試験に用いた。

市販缶ビール試料として、平成 13 年 1 月上旬に全国 9 都市(札幌、仙台、新潟、東京、

名古屋、大阪、広島、高松、博多)の酒販店にて国内主要4社の350 mL 缶ビールをサンプリングした。また、同時期に東京都並びに茨城県内にて同様に主要4社の500 mL 缶、1 L 缶、3 L 樽ビール等をサンプリングして試験に供した。

缶体及び缶蓋は、A社、B社、C社、D社の4社から、弊社に納入されたビール用のアルミ製350 mL 缶体及び缶蓋または同試作品を用いた。

缶内面塗料は、イ社及びロ社で製造され、上記の各缶メーカーで使用したエポキシ-アクリル系水性塗料を供与頂き分析に供した。

## B.2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ装置として、Hewlett-Packard社製HP-1100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、関東化学製Mightysil ODS 150 mm×2.1 mm I.D.(5 μm)及びGLサイエンス社製Inertsil ODS 150 mm×2.1 mm I.D.(5 μm)のいずれかを使用した。

質量分析計(MS)として、Micromass社製Quattro-Ultima型タンデム質量分析計(MS/MS)を使用した。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。

## B.3 測定条件

HPLCはカラム温度を30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80%になる様、グラジエント溶出を行った。

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で動作させ、コーン電圧60 V、衝突エネルギー20 eV、イオン源温度120、Desolvation温度300とした。測定モードは、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)で行い、測定質量数はm/z 227 212(BPA)とした。また、BPA-d<sub>16</sub>についてはコーン電圧60 V、衝突エネルギー20 eVで測定し、測定質量数はm/z 241 223(BPA-d<sub>16</sub>)とした。

## B.4 缶ビールの試験

試料ビールをガス抜きし、その50 mLを量りとり、内標準溶液(BPA-d<sub>16</sub>、5 μg/mL)50 μL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で脱水した。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。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)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5~20 μL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(m/z=212)及びBPA-d<sub>16</sub>(内標準、m/z=223)のピーク面積から、内標準法または標準添加法により、予め作成した検量線を用いて定量を行った。

## B.5 缶内面塗料のBPA含量測定

缶内面塗料1 mLを量りとり、内標準溶液

(BPA-d<sub>16</sub>, 5 µg/mL) 100 µL を加え、0.1 N 塩酸少量で酸性にした。これにヘキサン 5 mL を加えて、約 15 分間振とう抽出した。次にヘキサン層を分離し、その後さらに同様の抽出操作を 2 回繰り返し行った。これらのヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、エバポレータにより濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固した。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)を加え、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。以降 B.4 と同様に処理し測定を行った。

#### B.6 缶体の溶出試験

試料缶体を蒸留水で洗浄した後、5%アルコール溶液約 350 mL を入れて、缶蓋を付け巻き閉めを行った。これをオートクレーブに入れて、120 (または 100、80、60、40 の各温度)で 30 分間加温した。その後、直ちに水道水で冷却し、開缶して内容物を取り出した。

この液 50 mL を量りとり、内標準溶液(BPA-d<sub>16</sub>, 5 µg/mL) 50 µL を加え良く混合した後、固相抽出カラム(GL-Pak PLS-2)に負荷した。その後、吸引によりカラムを乾固した。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で脱水した。この液をエバポレータにより濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固した。これに移動相またはアセトニトリル/水混液(1:1)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。以降上記 B.4 及び B.5 と同様に処理し測定を行った。

### 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

BPA 標準試料及び夾雑成分の最も多いと考えられるビール試料等を用いて、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 MRM 測定条件に関して、BPA 及び BPA-d<sub>16</sub> 標準試料を LC/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。その結果、BPA の測定には m/z 227 212 のイオンが最も感度良く測定が可能であり、この場合のコーン電圧及び衝突エネルギーはそれぞれ、60 V、20 eV であった。また、BPA-d<sub>16</sub> では、同様にコーン電圧 60 V、衝突エネルギー 20 eV で測定し、測定質量数は m/z 241 223 とした。なお、Fig.1 及び Fig.2 には BPA と BPA-d<sub>16</sub> のプロダクトイオンを示した。

次に MS/MS 部を上記条件として、ビール試料を用いて移動相組成に関して検討した結果、アセトニトリル含量が 10~40%の範囲であれば、BPA は他成分と良好に分離することが明らかとなった。そこで、HPLC カラムに強く保持し、測定の妨害となる成分等を溶出する目的で、アセトニトリル含量 30% 80%(15 分間)とするグラジエント溶離とした。また、溶出試験試料並びに塗料試料では、BPA の妨害となる成分が認められないことから、本条件をそのまま適用して分析を行うこととした。

##### C.1.2 分析法のバリデーション

本条件により、ビール、溶出試験液、塗料液を試料とした各場合の分析法のバリデーションを行った。

ビール及び溶出試験液を試料とした場合、本法により BPA 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。本法のビール試料における BPA の定量限界は 0.3 ppb であり、繰り返し精度は変動係数で(cv)で 5%以内であった。

また、溶出試験では液中の BPA 濃度により、試験液を直接 LC/MS/MS 分析に供しても測定が可能であった。この様に本法は TMS 化-GC/MS[*sim*]法と比べて感度及び選択性が向上しているため、前処理を簡便化することが可能である。これにより処理中のコンタミネーションに対する配慮を簡略化出来る上、分析値の信頼性がさらに向上すると考えられる。

塗料の分析では、繰り返し精度は良好であったが、添加回収率が高値(約 140%)となった。これは前処理法を様々に変更しても改善が不可能であった。しかし、各塗料間の相対比較を行うことは可能であると考え、本法を用いて塗料中の BPA 含量を測定することとした。

## C.2 市販缶製品ビールの試験結果

現在国内で流通している主要メーカーの缶ビールには、製缶メーカー7社で製造された缶体が使用されている。各製缶メーカーは各々複数の工場を有しているため、同一メーカーの缶体であっても製造法は異なることが考えられる。そこで、これらを網羅出来る様、全国から市販缶ビールをサンプリングし試験した。

即ち、全国 9 都市でサンプリングした主要 4 社製缶ビール(350 mL 缶)計 36 試料及び東京都、茨城県内でサンプリングした缶ビール(500 mL 缶等)10 試料を試験に供した。

その結果、試験した全ての試料缶ビールから、BPA は検出されなかった(table 1)。

現在国内で生産される主要缶ビールに使用される缶体は、缶内面塗料及びその塗布、焼き付け方法等について検討が行われ、BPA の溶出を無くするための対策が講じられている。今回の試験結果から、市販主要 4 社製缶ビールでは、BPA 溶出の懸念はないことが明らかとなった。

## C.3 缶内面塗料の BPA 量調査結果

缶内面塗装からの BPA の溶出は、塗料中に残留する未反応の原料モノマーが原因と考えられている<sup>1)</sup>。そこで、弊社で入手出来た数種の缶内面コーティング用エポキシ-アクリル系水性塗料に関して、塗料中の BPA 含量を調査した。また、同一塗料メーカーで BPA 低減化のため、処方変更を行った前後での BPA 含量を比較した。

塗料から BPA を抽出する方法に関して液々抽出法を検討した。始めに抽出溶媒を選択する為、様々な有機溶媒を比較検討した。その結果、各塗料は多くの有機溶媒で塗料成分と抽出溶媒層が十分に分離しなかった。これに対しヘキサンでは、塗料成分とヘキサン層が分離し抽出操作上問題はなかった。そこで、ヘキサンを用いて回収試験を行った所、塩酸性下では再現性良く抽出されたが、回収率が約 140%となり定量性には問題が残った。この点を改善するため、更に検討を行ったが、満足な回収率を得る方法は見出せなかった。

これより本法では、BPA 含量を概算し相対的な含量比較を行うことは可能であると考え、各塗料の分析を行った。その結果、各塗料試料から BPA を検出し、その量は約 0.1~0.9  $\mu\text{g/mL}$  程度であった。Table 2 に試験結果を示した。また、Fig.3 にクロマト

グラムの一例を示した。

新旧処方 of 塗料で BPA 含量を比較すると、イ社品では旧処方が約 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であるのに対し、新処方では約 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と低減した。一方、ロ社品では旧処方が約 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、新処方が約 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となった。この様に、今回の試験から処方変更により、BPA 量が 1/2 ~ 1/4 程度に低減することが確認された。

#### C.4 缶体の溶出試験結果

ビール用アルミ缶の内面塗装は、防食・内容物の風味保持等の目的で施されており、その基本性能に関する試験方法は既に確立されている。しかし、塗膜に含まれる微量の BPA 量を測定し、内面塗装を評価する試験方法はない。そこで、ここでは缶体にビールを模した一定組成(5 %エタノール溶液)の試験液を封入し、40 ~ 120 の温度下に一定時間保持した後、BPA 溶出量を測定し評価を試みた。

その結果、特に温度条件に依存して液中に溶出する BPA 量は異なり、80 未満の温度では溶出は認められないが、これ以上の温度条件下では微量の溶出が認められることが明らかとなった。

そこで、加熱条件を溶出が認められる 120、30 分間に定め、弊社に納入された缶ビール用アルミ缶に関する溶出試験を実施した。その結果、新処方の塗料により製造した 4 製品の BPA 溶出量は、0.3 ~ 0.5  $\mu\text{g}$  程度であった。また新旧処方の塗料使用品で比較した場合、A 社及び B 社の 2 社製品で、ともに新処方塗料を使用した場合、BPA 溶出量が低下することが明らかとなった。これらの試験結果を Table 3 に示した。

一方、上記の各缶体は製造設備上の制約から、同様の塗料塗布法並びに焼付け処理により製造されている。従って、新旧処方缶内面塗料使用缶体で見出された BPA の溶出量の差異は、主として塗料中の BPA 含量差に由来すると考察される。従って、缶体製造時に BPA 含量の少ない高品質の内面塗料を用いることで、BPA の溶出を低減化出来ることが示唆された。

また、これらの溶出量は使用した塗料中の BPA 含量概算値及び塗料使用量から算出した塗膜中の BPA 残存量より高値であった。これより、塗料塗布後に行う焼付け等の処理で、塗膜の BPA 量が増加する可能性があることが明らかとなった。

なお、缶ビールは炭酸ガスを含有するため、高温下で保存する事は事実上不可能である。従って、BPA の溶出が市販の缶ビールで起こることは考えられないことを付記する。

#### D . 結論

ビール中の BPA を簡便かつ高精度に測定する LC/MS/MS 法を開発した。本法は、感度並びに選択性が高く、従来法より簡便な前処理で分析を行うことが可能となり、信頼性の高い試験結果が得られる。

本法により各種缶ビールについて BPA の含有量を調査した結果、主要市販缶ビールから BPA は検出されなかった。缶ビールは製造工程及び流通過程で高温下に晒されることはない。また、仮に製品の温度が上昇した場合、缶内のガス圧により栓が開き漏洩が起こる。従って市販主要缶ビールでは、BPA が検出されることはないものと推定される。

次に、ビール用アルミ缶体に関して一定条件で溶出試験を実施して、使用された缶内面塗料の品質と BPA 溶出量に関して調査した。その結果、BPA の溶出は 80 以上の高温条件下で認められ、溶出量は缶内面塗料の BPA 量に依存する傾向があることが明らかとなった。これより、缶体製造時に BPA を低減化した高品質の内面塗料を用いれば、BPA 溶出の可能性は、事実上殆ど無くなることが示唆された。

#### E．研究発表

論文投稿予定

#### F．知的所有権の所得状況

なし

#### G．参考文献

- 1) 河村 葉子：「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」平成 11 年度厚生科学研究費補助金研究成果報告書