

HPLC-ECDによる缶入り茶飲料中のビスフェノールAの分析

宮川 弘之*, 井部 明広*, 田端 節子*, 小沢 秀樹*,
貞升 友紀*, 安田 和男*

Determination of Bisphenol A in Canned Tea Drinks by HPLC with an Electrochemical Detector

HIROYUKI MIYAKAWA*, AKIHIRO IBE*, SETSUKO TABATA*,
HIDEKI OZAWA*, YUKI SADAMASU* and KAZUO YASUDA

A method for determining bisphenol A (4,4'-isopropylidene diphenol) in canned tea drinks using HPLC with an electrochemical detector was developed. Bisphenol A was extracted from samples using diethyl ether, and the extract was cleaned up with a Sep-Pak NH₂ cartridge. Thereafter, bisphenol A was determined by HPLC. The detection limit was 1.0 ng/g. Twenty-four brands of commercial canned tea drinks were analyzed using this method. Bisphenol A was detected from 9 brands, and ranged from 1.0 to 82.5 ng/g. As the inside coating material was distinguished by FT-IR, the detection frequency of bisphenol A was high when the inside coating of the can body was a kind of epoxy resin. On the other hand, bisphenol A was not detected when the inside coating of the can body was polyethylene terephthalate.

Keywords : ビスフェノールA bisphenol A, 電気化学検出器 electrochemical detector, 缶入り茶飲料 canned tea drinks, エポキシ樹脂 epoxy resin, 塩化ビニル樹脂 poly (vinyl chloride) resin, ポリエチレンテレフタレート polyethylene terephthalate (PET)

緒 言

ビスフェノールA(4,4'-isopropylidene diphenol, 以下BPAと略す)は, ポリカーボネート樹脂, エポキシ樹脂の原料の他, フェノール樹脂, 可塑性ポリエステル原料, あるいは塩化ビニルの安定剤などに用いられている.

一方, BPAは内分泌かく乱作用を有することが疑われており, Nagelら¹⁾は微量のBPAを妊娠マウスへ投与したところ, 産まれた雄マウスの前立腺重量が正常より重くなったことを報告している. また, von Saalら²⁾は同様な実験において, 産まれた雄マウスの精子産生量が正常より減少したことを報告している.

食用缶, 飲料缶の内面コーティングにはエポキシ樹脂や塩化ビニル樹脂が用いられているため, これらの缶入り食品の加熱殺菌時や保存時に残存BPAが食品中へ溶出することが懸念されている. Brotonsら³⁾は野菜缶詰の味液から一缶あたりND~22.9 µgのBPAを検出するとともに, 味液にエストロジェン活性を認めている. また,

Bilesら⁴⁾は缶入り幼児用飲料から0.1~13.2ppbのBPAを検出している. 更に, 河村ら⁵⁾, 堀江ら⁶⁾は缶入り飲料からそれぞれND~213ng/ml, ND~212.1ng/mlのBPAを検出している. これらのことから, 缶入り食品中のBPAの含有量を把握することは, 人への影響を考える上で重要である.

食品中のBPAの分析法としては, 蛍光検出器を用いたHPLC⁴⁾⁷⁾あるいはGC-MS⁵⁾, LC-MS⁶⁾による方法が報告されているが, フェノール類に対して感度, 特異性の優れている電気化学検出器(以下ECDと略す)を装着したHPLCによる方法はほとんど報告されていない.

缶入り茶飲料は, 日本茶, ウーロン茶, 紅茶, 健康茶などいろいろな種類があり, 消費量も多く, BPAが含まれている場合その摂取量が問題となることが考えられる. そこで, HPLC-ECDを用いて缶入り茶飲料中のBPAの分析を検討し, 市販品について適用したところ若干の知見を得たので報告する.

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

実験方法

- 1. 試料** 市販の缶入り茶飲料24銘柄46検体（緑茶：9銘柄11検体，ウーロン茶：5銘柄15検体，紅茶：6銘柄14検体，健康茶：4銘柄6検体）を用いた。賞味期限は1999年8月から2000年2月のものである。
- 2. 試薬** BPA：和光純薬工業製2,2-ビス（4-ヒドロキシフェニル）プロパン 純度95.0%以上，標準溶液：BPAをメタノールで100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように溶解し更にメタノールで適宜希釈して用いた。N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)：ジエールサイエンス(株)製，水：Mill-Q SP (Millipore社製)により製造した超純水をジエチルエーテルで洗浄した後煮沸したものを用いた。Sep-Pak NH_2 カートリッジ：Waters社製Sep-Pak Plus 使用前にメタノール10 ml クロロホルム10mlで洗浄して用いた。その他の試薬：いずれも市販の残留農薬試験用を用いた。
- 3. 装置** 高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-10AT型ポンプにESA社製クーロケム5100A型電気化学検出器を接続，ガスクロマトグラフ/質量分析計：Finnigan Mat社製GCQ，フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)：Nicolet社製 MAGNA-IR 560，全反射吸収測定装置：Spectra-Tech社製IR-Plan Advantage
- 4. HPLC測定条件** カラム：(株)ナカライテスク社製 Cosmosil 5C₁₈AR(4.6mm I.D. \times 150 mm)，カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ ，移動相：0.05M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) - メタノール - アセトニトリル (60:20:20)，流速：1.0ml/min，印加電圧：ガードセル 700mV。検出器 1 450mV。検出器 2 650mV，試料注入量：20 μl
- 5. GC-MS測定条件** カラム：J&W Scientific社製DB-5 MS(0.25mm I.D. \times 30m，膜厚0.25 μm)，カラム温度：100 (1 min) - 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 280 (5 min)，注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$ ，トランスファーライン温度：275 $^{\circ}\text{C}$ ，イオン化電圧：70eV，イオン化モード：EI，キャリアーガス：He，線速度：40cm/s，注入量：1 μl
- 6. HPLC用試験溶液の調製** 操作の概要をScheme 1に示した。
- 7. GC-MSによるBPAの確認** HPLCによりBPAが検出された試料は，以下の方法により試験溶液を調製後GC-MSにより分析し，同様に操作した標準品との比較によりBPAを確認した。

6で得られた試験溶液を濃縮乾固し，得られた残さをジクロロメタン500 μl で溶解した。これにBSTFA 100 μl を加え混和後，室温で15分間放置した。得られた反応溶液を適宜濃縮あるいは希釈し試験溶液とした。

```

Sample 20g
| extract twice with diethyl ether 20ml
Diethyl ether layer
| filter through filter paper 1PS
| evaporate to dryness
Residue
| dissolve in 10ml of chloroform
| transfer to Sep-Pak NH2 cartridge
| wash with 10ml of chloroform-ethyl acetate(9:1)
| elute with 6ml of chloroform-methanol(9:1)
Eluate
| evaporate to dryness
Residue
| dissolve in 1ml of methanol
HPLC
  
```

Scheme 1. Analytical Procedure for Bisphenol A in Canned Tea Drinks

- 8. 缶内面コーティングの材質鑑別** 缶胴，天蓋および底蓋から試験片を切り取り，全反射吸収測定装置付FT-IRによりIRスペクトルを測定し，標準品のスペクトルとの比較により材質を鑑別した

結果及び考察

- 1. HPLC測定条件の検討** ESA社技術資料*の条件に基づき，逆相系充填剤ODSに0.05M酢酸ナトリウム緩衝液 - メタノール - アセトニトリルの移動相を組み合わせBPAの分離条件を検討した。その結果，0.05M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) - メタノール - アセトニトリル (60 : 20 : 20) の移動相を用いることにより妨害ピークとの良好な分離が得られた。

次に，電気化学検出器の印加電圧について検討した。最適条件を決めるために，印加電圧に対する目的物質の反応電流をプロットしたC-V曲線を作成した。BPA 10ngを用いて作成したC-V曲線をFig.1に示した。その結果，妨害となる夾雑物質を酸化，排除するために用いる検出器1の印加電圧は，BPAが反応しない最高電圧である450mVとした。また，600mV以上の印加電圧で反応電流が一定になったので，測定電圧である検出器2の印加電圧は650mVとした。

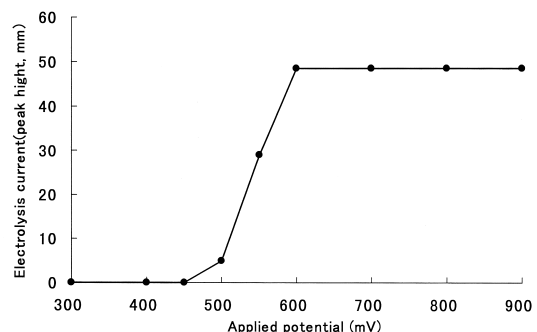


Fig 1. Effect of Applied Potential on Electrolysis Current Determining Bisphenol A

* ESA社版CoulArray Application Brief (1997)

Table 1. Recoveries of Bisphenol A from Spiked Samples

Sample	Added level (ng/g)	Recovery ^{a)} (mean ± SD%)
Green tea	5	71.8 ± 4.8
	50	76.6 ± 7.7
Oolong tea	5	70.5 ± 10.9
	50	85.0 ± 6.8
Black tea	5	70.1 ± 4.7
	50	64.2 ± 6.2

^{a)} Results of 3 replicates

2. 試験溶液調製法の検討 試料からのBPAの抽出は、平成7年度化学物質分析法開発調査報告書⁸⁾により良好な回収率が報告されているジエチルエーテルを用いることにした。

得られた抽出液中には、クロマトグラム上妨害となる夾雑物質が多く含まれていたため、カートリッジカラムによるクリーンアップについて検討した。

瀧野ら^{**}は魚体中のビスフェノールAの分析においてSep-Pak NH₂カートリッジを用いて良好な結果を得ている。そこで、Sep-Pak NH₂カートリッジを用いたクリーンアップ法について検討した。その結果、ジエチルエーテル抽出液の濃縮残さをクロロホルムに溶解してカートリッジに負荷し、クロロホルム-酢酸エチル(9:1)により洗浄した後、クロロホルム-メタノール(9:1)により溶出することにより夾雑物質を良好に除去することができた。クロロホルム-メタノール(9:1)4mlによりBPAが100%溶出されたことから、6mlで溶出することにした。

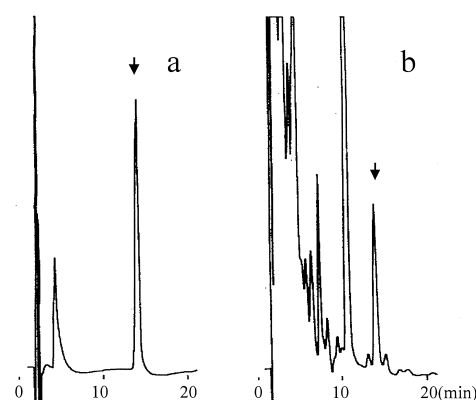


Fig.2. HPLC Chromatograms of (a)Standard Bisphenol A; (b)Black Tea Sample Containing 5.8ng/g of Bisphenol A

3. 検量線 BPA標準溶液を適宜各濃度に希釈し、検量線を作成した。定量はピーク面積法を用いた。0.4ngから4.0ngの範囲で良好な直線性を示した($r=0.9996$)。

4. 添加回収実験 四訂日本食品標準成分表⁹⁾に従い実験室で緑茶、ウーロン茶、紅茶を作成し、BPAが検出されないことを確認した後、標準品添加用試料とした。

この添加用試料にBPAを5ng/g、50ng/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。その結果、Table 1に示したように、紅茶で若干低い回収率となったが、ほぼ70%以上の回収率が得られた。本法による検出限界は、試料あたり1.0ng/gであった。

本法を用いて得られた標準品のクロマトグラムと、5.8ng/gのBPAが検出された缶入り紅茶飲料のクロマ

Table 2. Contents of Bisphenol A in Canned Green Tea Drinks

Sample	Supplied type	Can type	Inside coating			Content of BPA(ng/g)	Number of samples
			Lid	Body	Ends		
A	hot	3 piece	PVC ^{a)}	Epo ^{b)}	Epo	37.7	1
B	hot	3 piece	Epo	PET ^{c)}	Epo	ND ^{d)}	1
C	hot	2 piece	Epo		Epo	2.5	1
D	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1
D'	cold	2 piece	Epo		PET	ND	1
E	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1
E'	cold	2 piece	Epo		PET	ND	1
F	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1
G	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1
H	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1
I	hot	2 piece	Epo		PET	ND	1

a) PVC : a kind of poly (vinyl chloride) resin

b) Epo : a kind of epoxy resin

c) PET : polyethylene terephthalate

d) ND : <1.0ng/g

** 瀧野昭彦, 津田泰三, 小嶋美穂子, 他: 第35回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集, 122, 1998.

Table 3. Contents of Bisphenol A in Canned Oolong Tea Drinks

Sample	Supplied type	Can type	Inside coating		Content of BPA(ng/g)	Number of samples
			Lid	Body		
J	hot	2 piece	Epo ^{a)}	Epo	1.2 ± 0.0 ^{b)}	3
J'	cold	2 piece	Epo	Epo	1.1 ± 0.0 ^{b)}	3
K	hot	2 piece	Epo	Epo	2.4 ± 0.8 ^{b)}	3
K'	cold	2 piece	Epo	Epo	2.0 ± 0.7 ^{b)}	3
L	hot	2 piece	Epo	Epo	2.2	1
M	cold	2 piece	Epo	Epo	3.1	1
N	cold	2 piece	Epo	Epo	2.6	1

a) Epo : a kind of epoxy resin

b) Mean ± SD

トグラムをFig.2に示した。妨害ピークの少ない良好なクロマトグラムが得られた。この他の茶飲料も同様に良好なクロマトグラムが得られた。

5. 市販缶入り茶飲料中のBPA検出量及び内面コーティングの材質 本法を用いて市販缶入り茶飲料24銘柄中のBPA検出量を測定するとともに、各缶について缶胴、天蓋、底蓋の内面コーティング材質の鑑別を行った。また、BPAが検出されたものについては、GC-MSによりBPAであることを確認した。

1) 緑茶飲料ではTable 2に示したように、加温して販売されていたもの、冷却されていたものあわせて9銘柄中、A、Cの2銘柄からBPAが検出された。そのうちAは缶胴と底蓋がエポキシ系樹脂、天蓋が塩化ビニル系樹脂でコーティングされた3ピース缶であり、37.7ng/gと比較的多く検出された。また、Cは缶胴部分と天蓋がエポキシ系樹脂でコーティングされた2ピース缶であり、2.5ng/g検出された。その他の、缶胴部分がポリエチレンテレフタレート（以下PETと略す）でコーティングされた缶である

B、D~Iでは、いずれもBPAは検出限界以下だった。

2) ウーロン茶飲料ではTable 3に示したように、5銘柄すべてからBPAが検出された。検出量は、1.1~3.1ng/gと比較的少なく、大きな差がなかった。これらはすべて缶胴部分と天蓋がエポキシ系樹脂でコーティングされた2ピース缶であった。また、J、Kに見られるように、同じ銘柄で冷却されて販売されていたものと約55℃に加温して販売されていたものでは、保管温度によるBPA検出量に大きな違いは見られなかった。

3) 紅茶飲料では、Table 4に示すように6銘柄中2銘柄からBPAが検出された。これらP及びQは缶胴と底蓋がエポキシ系樹脂、天蓋が塩化ビニル系またはエポキシ系樹脂でコーティングされた3ピース缶であった。同じ銘柄のPの中でもP-1、P-2のように賞味期限の違いにより、天蓋のコーティングの材質がそれぞれ異なっており、BPAの検出量にも明らかに差が見られた。賞味期限が1999年10月の比較的古い試料P-1は、塩化ビニル系樹脂が用いられており、

Table 4. Contents of Bisphenol A in Canned Black Tea Drinks

Sample	Type	Supplied type	Can type	Inside coating			Content of BPA(ng/g)	Number of samples
				Lid	Body	Ends		
O	lemon	hot	3 piece	PVC ^{a)}	Epo ^{b)}	Epo	ND ^{d)}	1
P-1	straight	hot	3 piece	PVC	Epo	Epo	51.2, 82.5	2
P-2	straight	hot	3 piece	Epo	Epo	Epo	3.5 ± 1.9 ^{e)}	3
P-2'	straight	cold	3 piece	Epo	Epo	Epo	3.6 ± 2.4 ^{e)}	4
Q	straight	cold	3 piece	Epo	Epo	Epo	1.0	1
R	straight	cold	3 piece	Epo	Epo	Epo	ND	1
S	lemon	hot	2 piece	PVC		Epo	ND	1
T	apple	hot	2 piece	PVC		PET ^{c)}	ND	1

a) PVC : a kind of poly (vinyl chloride) resin

b) Epo : a kind of epoxy resin

c) PET : polyethylene terephthalate

d) ND : <1.0ng/g

e) Mean ± SD

Table 5. Contents of Bisphenol A in Canned Healthy Tea Drinks

Sample	Supplied type	Can type	Inside coating		Content of BPA(ng/g)	Number of samples
			Lid	Body		
U	hot	2 piece	Epo ^{a)}	PET ^{b)}	ND ^{c)}	1
U'	cold	2 piece	Epo	PET	ND	1
V	hot	2 piece	Epo	PET	ND	1
V'	cold	2 piece	Epo	PET	ND	1
W	hot	2 piece	Epo	PET	ND	1
X	hot	2 piece	Epo	PET	ND	1

a) Epo : a kind of epoxy resin

b) PET : polyethylene terephthalate

c) ND : <1.0ng/g

BPAが51.2, 82.5ng/gと比較的多く検出された。賞味期限が2000年1～2月と新しいP-2, P-2'はエポキシ系樹脂が用いられており, BPA検出量は3.5～3.6ng/gと少なかった。

しかし, O及びRはPと同様に缶胴と底蓋がエポキシ系樹脂, 天蓋が塩化ビニル系あるいはエポキシ系樹脂でコーティングされていたが, BPAは検出限界以下だった。

また, S及びTも缶胴部分がエポキシ系樹脂あるいはPET, 天蓋が塩化ビニル系樹脂でコーティングされた2ピース缶であるが, BPAは検出限界以下だった。

なお, P-2, P-2'のように, 同一の銘柄で同種のコーティングのものにおいて, 冷却されて販売されていたものと約55℃に加熱されていたものでは, ウーロン茶飲料と同様に保管温度によるBPA検出量に大きな違いは見られなかった。

4) 健康茶飲料はTable 5に示したように, 4銘柄すべてが缶胴部分がPET, 天蓋がエポキシ系樹脂でコーティングされた2ピース缶であったが, BPAはすべて検出限界以下だった。

以上の結果, 缶胴部分のコーティングがエポキシ系樹脂のものでは12銘柄中9銘柄からBPAが検出され, PETの12銘柄はすべて検出限界以下だった。このことから, 缶入り茶飲料中のBPAの検出率は, 主に内面コーティングの材質により違いがあることがわかった。

6. BPA検出量に及ぼす内面コーティングの材質の違い

今回, 缶胴部分にエポキシ系樹脂を用いている銘柄からBPAが多く検出されたことは, 缶入り飲料製造の際の加熱殺菌時に, 樹脂中に遊離, 残存していたBPAが飲料中に溶出したことによるものと考えられた。

同様に缶胴部分にエポキシ系樹脂を用いているにもかかわらずBPAが検出限界以下であったものは, 加熱殺菌時の加熱時間, 温度条件の違いの他, エポキシ系樹脂中の遊離BPAを減少させるような改良がなされたものと思われる。

一方, 缶胴部分のコーティングにPETが用いられている缶では, 天蓋にエポキシ系樹脂が用いられているにもかかわらずBPAはすべて検出限界以下だった。このことは, 天蓋に用いられるエポキシ系樹脂は缶胴部分と異なり, 塗装時に270～280℃の高温で焼き付けられるため, 樹脂中の遊離BPAが塗装時に揮散したためと考えられた。

また, 天蓋のコーティングに塩化ビニル系樹脂を使用している銘柄ではBPA量が多いものがある一方, 検出限界以下のものもあった。この違いは, 塩化ビニル系樹脂の安定剤としてのBPA添加量の違い, 加熱殺菌時の温度条件の違い, 天蓋以外の他の部位の塗装からのBPA溶出の有無によるものと考えられた。

また, 同じ銘柄で同じ内面塗装のものにおいて, 製造時から開缶時までの保存期間の違いによるBPA検出量の違いは認められなかった。さらに, 同一の銘柄において冷却して販売されていたものと約55℃に加熱して販売されていたものとでBPA量に違いが見られなかった。これらのことから, 遊離のBPAは缶入り茶飲料の加熱殺菌時にそのほとんどが溶出し, 通常の販売における保管条件では飲料中にBPAが溶出することはないものと思われる。

試料P-1, P-2のように, BPAの検出量が多かった銘柄でも最近製造されているものはBPAの含有量が少なくなっており, メーカーでもBPAの溶出が少なくなるよう塩化ビニル系樹脂からエポキシ系樹脂へ内面塗装の種類を変えたり, 遊離のBPAが少ないタイプのエポキシ系樹脂を使用するなど改良を行ってきていることが推察された。

まとめ

缶入り茶飲料中のBPAのHPLC-ECDによる分析法を

検討し、市販品における検出量を調査した。

試料をジエチルエーテルで抽出した後、Sep-Pak NH₂ カートリッジによりクリーンアップを行い、HPLC-ECDで分析する方法を作成した。本法による回収率は、各種茶飲料にBPAを5 ng/g, 50ng/gの濃度になるように添加した場合、64.2~85.0%だった。定量限界は、1.0 ng/gであった。

本法を用いて市販の缶入り茶飲料24銘柄を分析したところ、9銘柄から1.0~82.5ng/gのBPAが検出された。内面コーティングの材質をFT-IRにより鑑別したところ、缶胴部分のコーティングがエポキシ系樹脂のものでBPAの検出率が高く、PETのものはすべて検出限界以下だった。BPAが多く検出された銘柄でも、賞味期限が2000年代のものでは検出量が少ない傾向が見られ、BPA溶出量を減少させるよう内面コーティングの材質等が改良されていることが示唆された。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第77回学術講演会1999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) Mountfort, K.A., Kelly, J., Jickells, S.M., *et al.* : *Food Additives and Contaminants*, **14**, 737-740, 1997.
- 8) 環境庁環境保健部環境安全課 : 平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, 195-213, 1996.
- 9) 科学技術庁資源調査会 : 四訂日本食品標準成分表, 537-538, 1982, 大蔵省印刷局, 東京.