

LC-TOF-MS を用いた 缶コーティング/食品の相互作用についての考察

アプリケーション

食品安全性

著者

M. Driffield, E. L. Bradley, and L. Castle
Central Science Laboratory
Sand Hutton
York, YO41 1LZ
UK

J. Wagner and B. Wedzicha
Proctor Department of Food Science
University of Leeds
Leeds, LS2 9JT
UK

J. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要旨

このアプリケーションノートでは、飛行時間型質量分析計を使用した食品用の缶コーティングの分析について説明します。精密質量情報を用いて、未知の移入物質を信頼性高く同定しました。

緒言

食料品の包装に使用される金属缶の内部表面は、食品と金属の間に皮膜を形成するために、多くの場合、コーティングが施されます。コーティング剤には、樹脂、架橋剤、触媒、潤滑剤、湿潤剤、溶剤などのさまざまな成分が含まれます。これらの成分原料やその反応副生成物は、缶コーティングから食品中に移入する可能性があります。

脂肪や水などの原料は、コーティングを膨潤させる可能性があります。特に包装中に加熱処理する場合、膨潤による移入が進む恐れがあります。また、接触時間や温度、コーティングの種類と厚み、移入する物質の分子量とサイズなどの要因に、移入の可能性は依存します。缶コーティングと食料品の相互作用について考察することは、缶コーティングから食料品への化合物の移入を認識し、その削減を図るうえで重要です。

以前のアプリケーションノートでは、エポキシ樹脂 [1] やポリエステル樹脂 [2] を主体とした缶コーティングの分析において、親化合物とフラグメントイオンに関する精密質量情報により、未知化合物の同定の信頼性が大幅に高まることを紹介しました。このアプリケーションノートでは、缶コーティング/食品相互作用の研究を支援するツールとして、どのように液体クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析計 (LC/TOF-MS) が利用されたかを記述します。

実験

コーティングしたパネル

金属パネルにエポキシフェノリック (EPH) ラッカーを塗り、200 °C で 10 分間、オープンで硬化させました。

パネルから面積 9 cm² の小さなテスト標本を切り出し、移入の研究にすぐ使えるように折り畳みました。

ひまわり油への浸漬

コーティングパネルの折り畳んだテスト標本を、シリコンオイルバスで 121 °C にした加圧バイアル中のひまわり油に、10、20、30、40、50、60、70、120 分間、浸しました。曝した後、コーティング金属パネル標本を拭いてオイルを取り除き、アセトニトリル (25 mL) に終夜浸しました。アセトニトリルの一部 (1 mL) を 0.2 mm PTFE フィルターでろ過しました。



Agilent Technologies

塩酸処理

濃縮した (10 倍) EPH アセトニトリル抽出物 (500 μ L) に、濃塩酸 (100 μ L) を添加しました。これを密閉したバイアルの中に入れ 18 時間、60 $^{\circ}$ C で放置して反応させ、アセトニトリルで 1 mL に調整しました。

液体クロマトグラフィー – 蛍光検出 (LC-FLD)

機器: Agilent 1200 シリーズ LC と G1321A FLD
移動相: A = 0.1% 酢酸水溶液
B = アセトニトリル
グラジエント: t = 0 分/B = 35%、t = 5 分/B = 50%、
t = 10 分/B = 50%、t = 20 分/B = 100%、
t = 25 分/B = 100%
流量: 1.0 mL/min
カラム: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18、
100 mm x 2.1 mm、粒径 3.5 μ m
(部品番号 961753.902)
注入量: 20 μ L
励起波長: 275 nm
発光波長: 305 nm
ゲイン: 2¹⁰

LC-FLD-TOF-MS

機器: Agilent 1200 シリーズ LC と G1321A FLD
と TOF ポジティブエレクトロスプレー
移動相: A = 0.1% 酢酸水溶液
B = アセトニトリル
グラジエント: t = 0 分/B = 35%、t = 5 分/B = 50%、
t = 20 分/B = 50%、t = 30 分/B = 100%、
t = 40 分/B = 100%
流量: 0.3 mL/min
カラム: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18、
100 mm x 2.1 mm、粒径 3.5 μ m
(部品番号 961753.902)
注入量: 5 μ L
励起波長: 275 nm
発光波長: 305 nm
ゲイン: 2¹⁰
ネブライザ圧力: 30 psi
キャピラリー電圧: 4,000 V
ガス温度: 325 $^{\circ}$ C
乾燥ガス: 10 L/min
フラグメンター電圧: 150 V

アシル化

Biedermann と Grob により報告されたメソッドが用いました [3]。EPH アセトニトリル抽出物の一部 (5 mL) を窒素気流下で乾固させました。無水酢酸 (25 μ L) とピリジン (25 μ L) を添加し、15 分間、放置して反応させました。

窒素気流下で蒸発させることで過剰な試薬を除去し、残留物をアセトニトリル (500 μ L) に再溶解しました。また、EPH アセトニトリル抽出物の別の一部 (5 mL) を窒素気流下で蒸発させ、上記のように無水酢酸と反応させました。蒸発によって過剰な試薬を除去した後、トリフルオロ酢酸 (TFAA、100 μ L) を添加しました。15 分間、これを放置して反応させ、窒素気流下での蒸発により過剰な試薬を除去しました。乾燥した残留物を、アセトニトリル (500 μ L) に再溶解しました。

結果と考察

一般的な EPH コーティングで塗装されたパネルを用いた移入試験では、2 つの共溶出ピークが LC-FLD によって考察しました。類似した保持時間に溶出する一組のピークの同定は、シクロ-ジ-BADGE の 2 つの異性体として、文献中で以前に報告されています [4]。シクロ-ジ-BADGE の構造式を図 1 に示します。

121 $^{\circ}$ C のひまわり油への浸漬時間を変えた EPH コーティングパネルの共溶出ピークの違いを図 2 に示します。2 つのピーク、2-1 と 2-2 のプロファイルは時間によって違っているように見えます。浸漬時間を延ばすにつれて、ピーク 2-1 の相対ピーク高さは、ピーク 2-2 の高さと比較して減るため、速い速度でこの化合物が移入することを示しています。浸漬時間 120 分では、2 つのピークはおおよそ等しいピーク高さになりました。

以前のアプリケーションノート [1,2] で示した高い TOF-MS の定性能力が、共溶出ピークの信頼性の高い同定と、観察された移入の挙動についての考察のため、EPH 抽出物に関して用いられました。LC-FLD での 1.0 mL/min の流量は、LC-TOF-MS (ESI イオン源は 1.0 mL/min

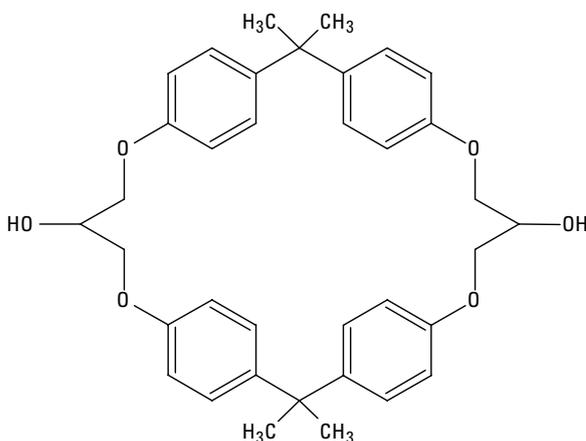


図 1. シクロ-ジ-BADGE、C₃₆H₄₀O₆ の構造式

を許容可能) で使用するには高すぎると判断しました。そのため、LC 条件を変更しました。TOF-MS は、FLD の下流に直列に接続しました。図 3 に、濃縮アセトニトリル EPH 抽出物の FLD クロマトグラムを示します。傾斜の緩やかなグラジエント条件のため、ピークの溶出時間は遅くなり (22.4 分と 23.15 分)、カラム内での滞留時間の増加がより増加した固定相との相互作用を生み出すため、その結果、3 つのピークが確認され、これらのピーク間での分離度の改善が確認されました。

このクロマトグラム (図 4) の TOF-MS データを見ると、これはより明白にわかります。22.13 分に 4-1、22.61 分に 4-2、23.45 分に 4-3 の 3 つのピークがあります。図 5 と表 1 に示したとおり、ピーク 4-2 と 4-3 は、同じマススペクトルと分子式 ($C_{36}H_{40}O_5$) を持ちます。

ピーク 4-1 は異なる分子式 ($C_{25}H_{34}O_5$) を持つことが考えられ、このデータから、ピーク 4-1 の分子式は $C_{25}H_{34}O_5$ で、BADGE.BuOH であると考えられます。これは、以

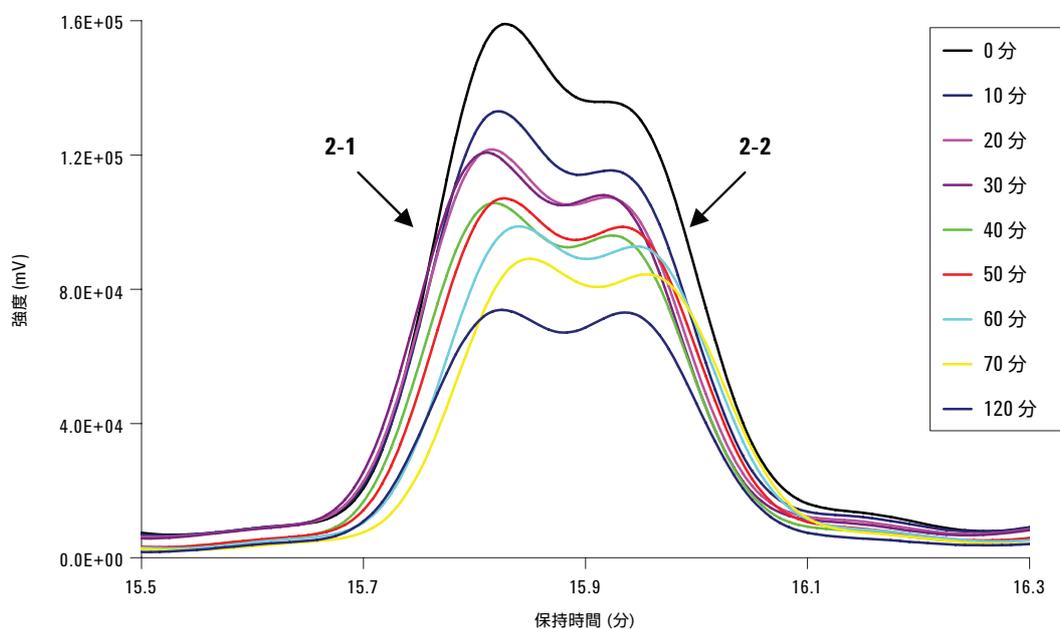


図 2. さまざまな時間、EPH 缶コーティングをひまわり油に浸漬させて得た LC-FLD クロマトグラム

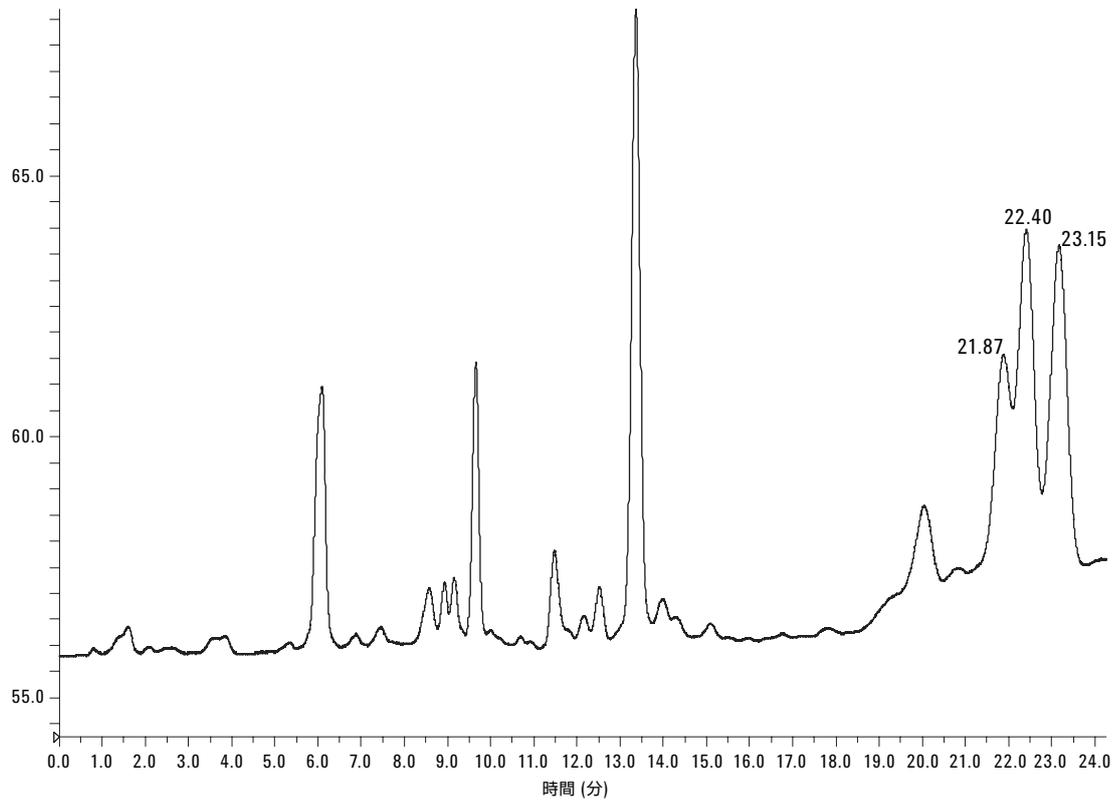


図3. 濃縮 EPH アセトニトリル抽出物の LC-FLD クロマトグラム

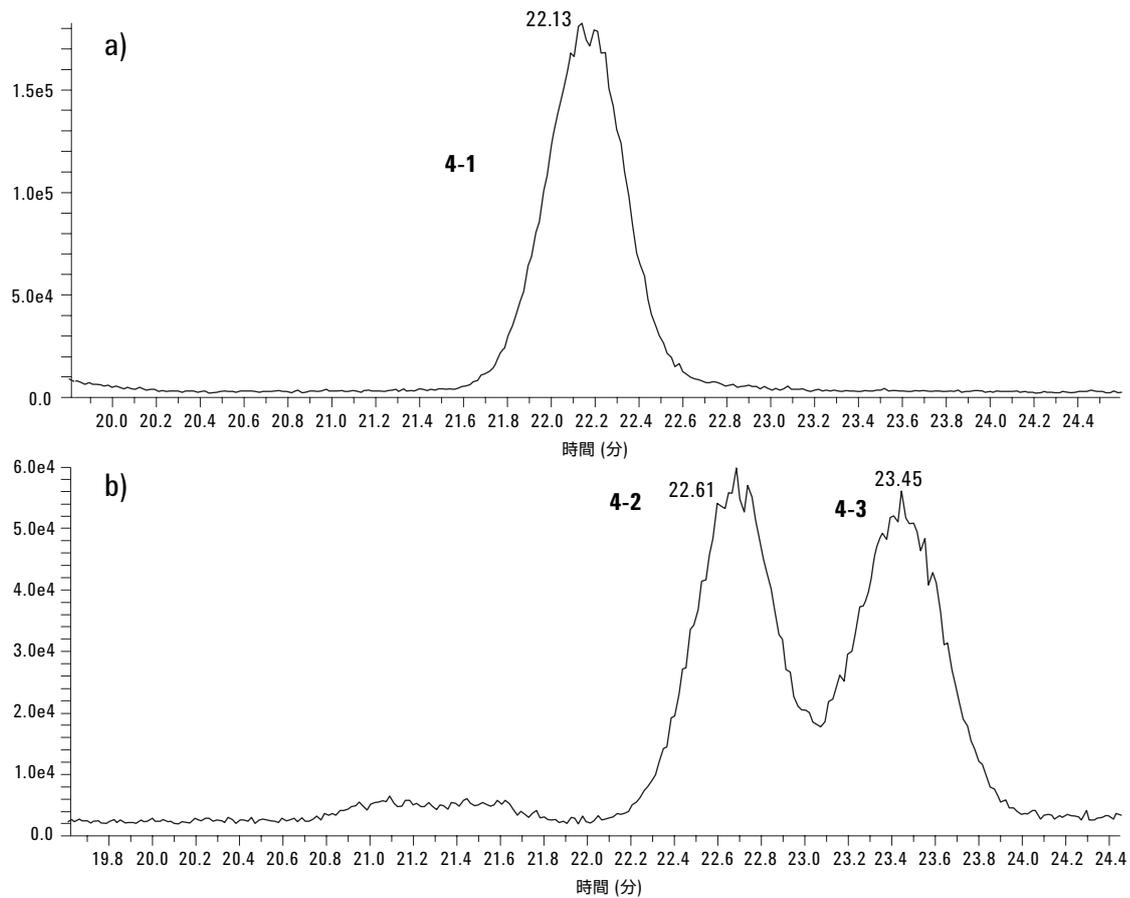


図4. 3つの対象ピークの抽出イオンクロマトグラム: a) m/z 436.98 ~ 437.48 と b) m/z 591.03 ~ 591.53

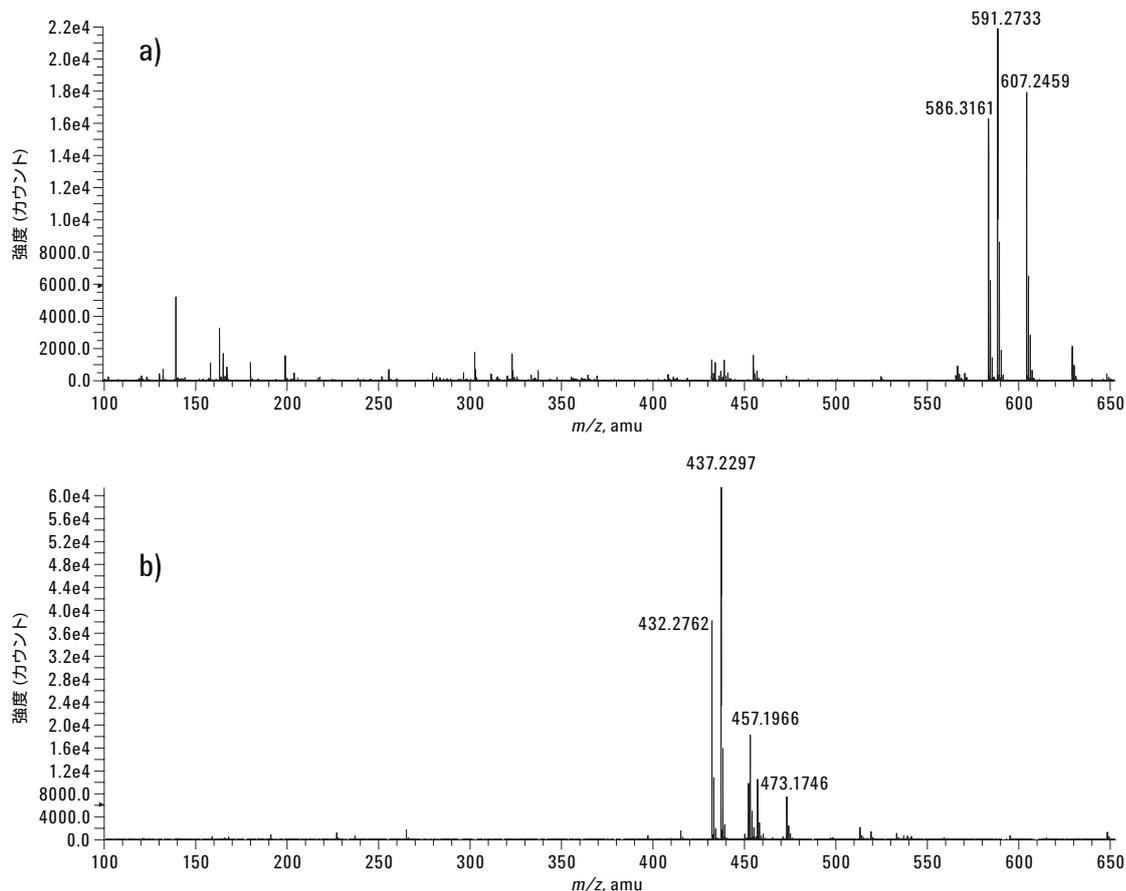


図 5. ピーク a) 4-1、b) 4-2 と 4-3 のマススペクトル

表 1. ピーク 4-1、4-2、4-3 の分子式データベース情報

ピーク	質量	予想される分子式	理論質量	質量誤差 (PPM)	分子付加体
4-1	432.2746	$C_{25}H_{38}NO_5$	432.2744	0.12	M+NH ₄
	437.2300	$C_{25}H_{34}O_5Na$	437.2298	0.35	M+Na
4-2	586.3163	$C_{36}H_{44}NO_6$	586.3163	-0.026	M+NH ₄
	591.2722	$C_{36}H_{40}O_6Na$	591.2717	0.83	M+Na
4-3	586.3161	$C_{36}H_{44}NO_6$	586.3163	-0.37	M+NH ₄
	591.2725	$C_{36}H_{40}O_6Na$	591.2717	1.3	M+Na

前のアプリケーションノート [1] で報告されたメソッドに基づき同定しました。抽出物に HCl を添加することで、これを確認しました。HCl が残りのエポキシ環に付加するので、予想したとおり、BADGE.BuOH のピークは消え、BADGE.BuOH.HCl の分子式のピークに置き換えら

れました。図 6 に関連する抽出イオンクロマトグラムを示します。図 7 に、BADGE.BuOH.HCl のマススペクトルを示します。実験結果と理論上の塩素の同位体パターンの中で優れた相関関係がありました。

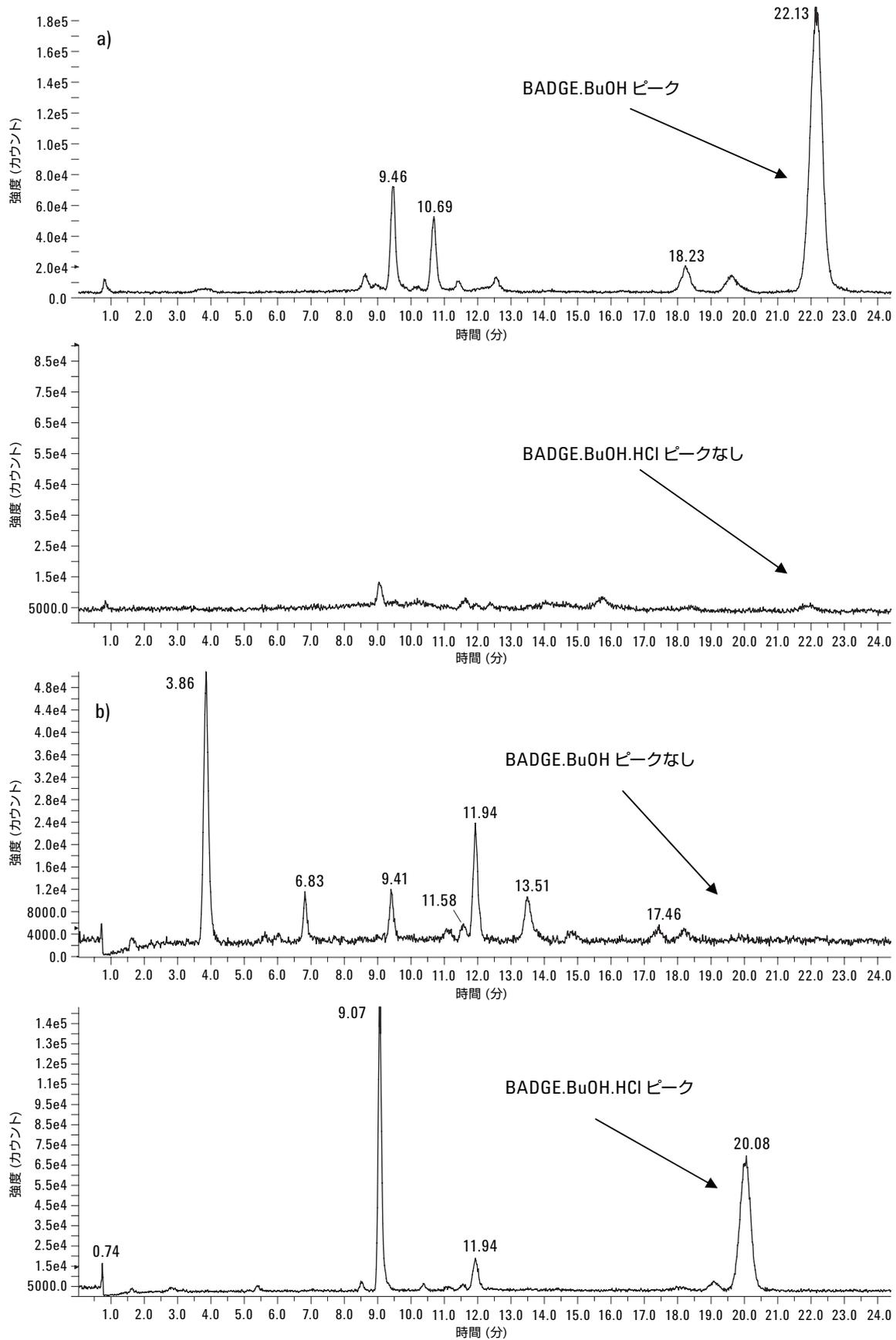


図 6. a) 未処理 EPH 抽出物と b) HCl で処理した EPH 抽出物に対する BADGE.BuOH (m/z 437 – 438) と ADGE.BuOH.HCl (m/z 451 – 452) の抽出イオンクロマトグラム

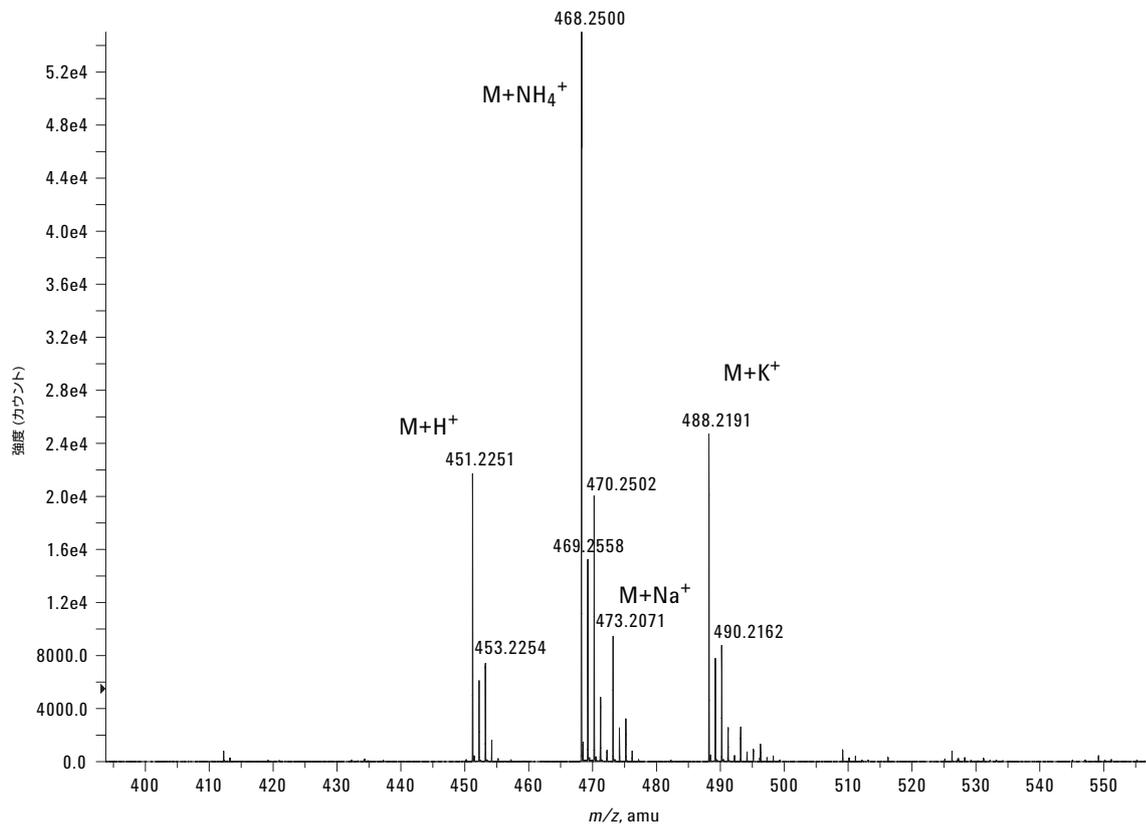


図 7. BADGE.BuOH.HCl に一致する、20.1 分のピークのマススペクトル

ピーク 4-2 と 4-3 は同じマススペクトルを持ち、 $C_{36}H_{40}O_6$ であると推定されます。先述したシクロ-ジ-BADGE に一致したものと同様に、ピーク 4-2 と 4-3 は、同じ分子式 (図 8 参照) を持つ、直鎖 BADGE 誘導体である BADGE.BPA に相当するものと考えられます。

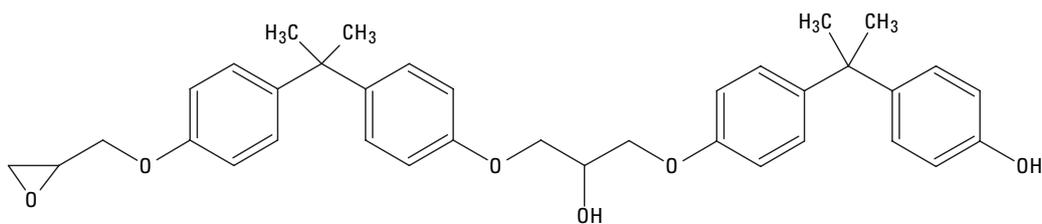


図 8. BADGE.BPA、 $C_{36}H_{40}O_6$ の構造式

HCl を添加しても 2 つの共溶出ピークに変化はみられませんでした。これは、HCl がエポキシ環に付加されるため、BADGE.BPA によるピークは消えると予想されるため、これらは実際にシクロ-ジ-BADGE によるもので、BADGE.BPA ではないことを示します。この結果をさらにテストしました。推定された構造の違いとして、シクロ-ジ-BADGE には 2 つの水酸基がありますが、BADGE.BPA には 2 つの水酸基に加え、エポキシサイドの官能基を有しています。無水酢酸と TFAA が水酸基とエポキシサイド基に異なる反応を示したことが報告されました [3]。無水酢酸により、遊離した水酸基のアシル化を引き起こしますが、TFAA をさらに加えることで、エ

ポキシド環全体のアシル化が起こります (図 9 参照)。無水酢酸での処理後の EPH 抽出物の LC-TOF-MS 分析により、化合物 9-1 または 9-2 (C₄₀H₄₄O₈) のいずれかの二重にアシル化された化合物の存在を示しました。TFAA をさらに添加した後、化合物 9-3 に一致するピークがないことから、実際に 2 つの共溶出ピークは両方、シクロ-ジ-BADGE によるものであることを示します。2 つのピークの理由は、形成中にフェノール基がエポキシド環を攻撃する側に応じて、お互いにシスまたはトランスの位置に 2 つの水酸化物基を持つ立体異性体が存在するためと考えられます [3]。

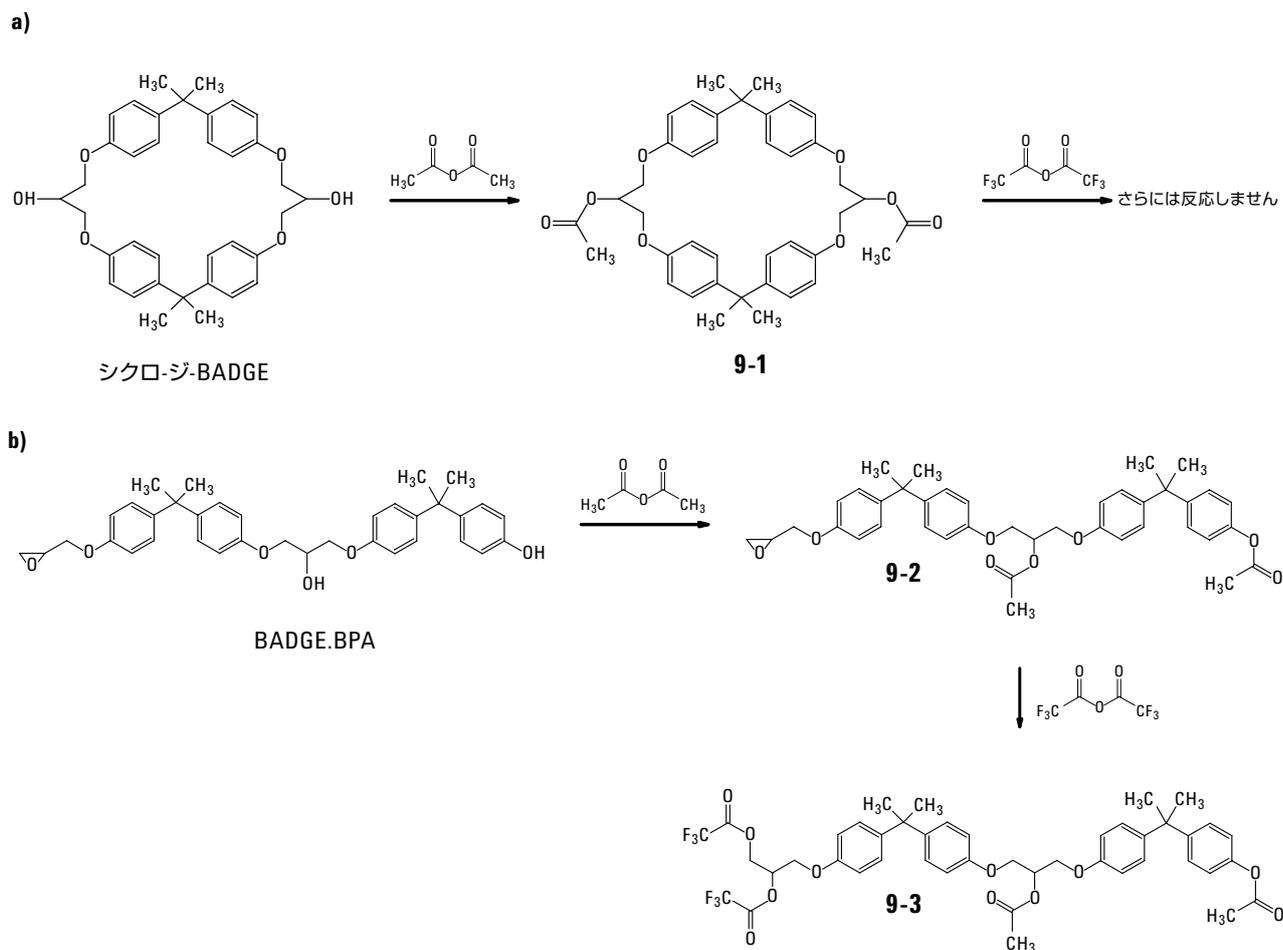


図 9. a) シクロ-ジ-BADGE と b) BADGE.BPA のアシル化反応

結論

リーズ大学における研究では、ひまわり油への浸漬時間を変化させて2つの共溶出ピークの変化を考察しました。実際には3つの共溶出ピークがあり、LC-TOF-MSを用いて同定しました。最初のピークはBADGE.BuOHと同定され、2番目と3番目のピークはシクロ-ジ-BADGEのシスとトランスの異性体と確認しました。最初の考察で観察された違いは、BADGE.BuOHとシクロ-ジ-BADGEの構造の違いによるものです。BADGE.BuOHはシクロ-ジ-BADGEよりも速く模擬溶液に移入し、シクロ-ジ-BADGEの2つの立体異性体は同じ速度で移入します。これによりピーク高さの違いが生じます。

参考文献

1. M. Driffield, E. L. Bradley, L. Castle, and J. Zweigenbaum, "Identification of Unknown Reaction By-Products and Contaminants in Epoxyphenolic-Based Food Can Coatings by LC-TOF-MS" (2006) Agilent Technologies publication 5989-5898EN
2. M. Driffield, E. L. Bradley, L. Castle, and J. Zweigenbaum, 「Molecular Feature Extractionとデータベース検索を用いたLC/TOF-MSによる食品用缶内面のポリエステルコーティング中の未知ポリエステルオリゴマーの同定」(2007)、資料番号5989-7393JAJP
3. M. Biedermann and K. Grob, "Food Contamination from Epoxy Resins and Organosols Used as Can Coatings: Analysis by Gradient NPLC," *Food Additives & Contaminants*, (1998) 15, 5, 609-618.
4. A. Schaefer and T. J. Simat, "Migration from Can Coatings: Part 3. Synthesis, Identification and Quantification of Migrating Epoxy-Based Substances Below 1000 Da," *Food Additives & Contaminants*, (2004) 21, 4, 390-405.

謝辞

本研究は、環境食糧農林省 (DEFRA) 関連プロジェクト: FQS45 「食品用缶コーティングの新技术と化学的性質」の一部として行いました。DEFRA、Valspar Corporation、Impress Group、H. J. Heinz に謝意を表します。なお、本論文の内容は著者の研究成果であり、後援組織の意向を示すものではありません。

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本文書掲載の装置類は薬事法に基づく登録は行っておりません。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
March 11, 2008
5989-8053JAJP