

GC/MS と LC/MS による 食品中のフタル酸エステル類の 迅速かつ高感度な検出

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Jimmy Chan
Agilent Technologies Taiwan Ltd.
Taipei 104
Taiwan

Feng Shuang
Agilent Technologies Co. Ltd (China)
Guangzhou 510613
Peoples Republic of China

概要

食品の安全性に関する世界的な関心はますます高まりを見せています。台湾ではジュース飲料やその他の食品へのフタル酸エステル類の違法な混入が発覚しました。食品汚染の検出のため、感度と信頼性に優れた質量分析装置で実用できる分析メソッドの迅速な開発が求められています。アジレントは、食品中のフタル酸エステル類の検出が可能な GC/MS と LC/MS の高感度定量メソッドを開発しました。



Agilent Technologies

はじめに

フタル酸エステル類は、プラスチックの柔軟性、透過性、耐久性、寿命を向上させる可塑剤として使用されています。フタル酸エステル類には、錠剤の腸溶コーティングから沈殿防止剤や乳化剤まで、多様な用途があり、粘着剤および接着剤、エレクトロニクス、パーソナルケア製品、医療機器、チューブ、パッケージ、子供用玩具など、幅広い製品で使用されています。これらの化合物は、混合対象のプラスチックと共有結合していないため、環境へ容易に放出されます。これまでの研究で、喘息、内分泌攪乱、生殖異常、癌、低出生体重児、自閉症、ADHD など、健康上の多くの問題に対するフタル酸エステル類の関与が示唆されています。その結果、欧州連合 (EU)、米国 (USA)、その他数か国がフタル酸エステル類に対する曝露の規制を開始しました。欧州連合 (2005/84/EC) では 2007 年以降、米国では 2009 年以降、子供用玩具への 6 種類のフタル酸エステル類の使用を制限しています (表 1)。

2011 年 5 月には、スポーツドリンク、果実ジュース、紅茶飲料、果実ジャム、食品粉末に、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP) が代用混濁剤として違法に添加されていることが明らかになりました。混濁剤 (乳化剤) は、果実ジュースやその他の製品の外観を向上させます。フタル酸エステル類は、このケースではパーム油の代用として使用されていました。これらの製品は即座に回収されました。また、輸出された可能性があるため、世界規模での注意が促されました。フタル酸エステル類の最大許容限界値は、中国および台湾では、現時点で 1 ppm です。

不適切な製造プロセスから消費者を保護するために、食品に含まれるフタル酸エステル類の存在を迅速に検出する高感度かつ高信頼性のメソッドが必要とされています。このアプリケーションノートでは、GC/MS と LC/MS のいずれのプラットフォームでも実行可能で、US および EU で規制されている 6 種類を含むフタル酸エステル類化合物を高い感度で検出できるメソッドについて説明します。GC/MS および LC/MS メソッドは、シングルとトリプル両方の四重極型質量分析装置で実行できます。GC/MS メソッドでは 50 ppb のフタル酸エステル類を検出できます。LC/MS メソッドでは、トリプル四重極 MS を使用すれば 1 ppb までの高感度の分析を実現することができます。いずれも、米国、EU、中国、および台湾の規制の許容レベルを超えるフタル酸エステル類が食品に含まれないことを確認するのに十分な検出感度を有しています。

表 1. 最も一般的に使用されるフタル酸エステル類

化合物名	略語
フタル酸ジブチル	DBP
フタル酸ベンジルブチル	BBP
フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)	DEHP
フタル酸ジ-n-オクチル	DNOP
フタル酸ジイソノニル	DINP
フタル酸ジイソデシル	DIDP
フタル酸ジメチル	DMP
フタル酸ジエチル	DEP
フタル酸ジプロピル	DPP
フタル酸ジブチル	DBP
フタル酸ジイソブチル	DIBP
フタル酸ジメトキシエチル	DMEP
フタル酸ジプロピル	DPP
フタル酸ペンチルイソペンチル	PIPP
フタル酸ジイソペンチル	DIPP
フタル酸ビス (2-エトキシエチル)	DEEP
テレフタル酸ジエチルヘキシル	DEHT
フタル酸ジアリル	DASP
フタル酸ブチルベンジル	BBP
フタル酸ジプロピルヘプチル	DPPH
フタル酸ジシクロヘキシル	DCHP
フタル酸ジヘキシル	DHP
フタル酸ビスメチルフェニル	BMPP
フタル酸ブチルオクチル	BOP
フタル酸ジベンジル	DBZP
フタル酸ジヘプチル	DHEPP
フタル酸ジイソヘプチル	DIHEPP
フタル酸ヘキシルエチルヘキシル	HEHP
フタル酸ベンジルブチル	BBEP
フタル酸ジイソオクチル	DIOP
フタル酸ジエチルヘキシル	DEHP
フタル酸ジオクチル	DOTP
フタル酸ジノニル	DNP
フタル酸ジウンデシル	DUP
アジピン酸ビス (2-エチルヘキシル)	DEHA
フタル酸ジ-n-ヘキシル	DNHP

太字の斜体で示した 6 種類のフタル酸エステル類は、米国および EU で規制されています。

実験方法

試薬および標準

GC 標準溶液: フタル酸ジブチル (DBP、CAS 84-74-2)、フタル酸ベンジルブチル (BBP、CAS 85-68-7)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP、CAS 117-81-7)、フタル酸ジ-n-オクチル (DNOP、CAS 117-84-0)、フタル酸ジイソデシル (DIDP、26761-40-0)、フタル酸ジイソノニル (DINP、28553-12-0) は ChemService (米国、ペンシルバニア州、ウェストチェスター) から購入しました。標準溶液はジクロロメタンに溶解しました。

LC 標準溶液: 30 種類のフタル酸標準を Dr. Ehrentorfer GmbH から購入しました。100~1,000 µg/mL が含まれる個別のフタル酸保存溶液をメタノールで調製しました。検量線を作成するために、10 µg/mL の各フタル酸が含まれる作業用標準溶液を、メタノールを希釈に使用して調製しました。

装置

GC/MS および GC/MS/MS は、Agilent 7890A GC システムを Agilent 5975C GC/MSD または 7000B トリプル四重極 GC/MS と組み合わせて分析を行いました。LC/MS および LC/MS/MS は、Agilent 1260 RRLC HPLC システムを Agilent 6150 シングル四重極 LC/MS または Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS と組み合わせて分析を行いました。機器の条件を表 2~4 に示します。

表 2. GC/MS および GC/MS/MS の条件

GC の実行条件

カラム	Agilent J&W DB-5MS ウルトライナートキャピラリー GC カラム、30 m x 0.25 mm、0.25 µm (p/n 122-5532UI)
注入量	1 µL
注入口温度	290 °C
注入モード	スプリットレス
オープンプログラム	120 °C (1 分) 120~300 °C (20 °C/min) 300 °C (5 分)
ポストラン	300 °C (5 分)
キャリアガス	ヘリウム、1.2 mL/min
トランスファーライン温度	300 °C

Agilent 5975C シリーズ GC/MSD (シングル四重極) の条件

取り込みパラメータ	EI、SIM/スキャン
スキャンモード	50~500 amu

Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS の条件

モード	EI、MRM
ソース温度	230 °C
四重極温度	Q1 および Q2 = 150 °C
チューンファイル	atunes.eiextune.xml
コリジョンガス流量	窒素 (1.5 mL/min)、 ヘリウム (2.25 mL/min)
検出器ゲイン	15

表 3.30 種類のフタル酸エステル類を分離するための LC/MS の条件

LC の実行条件

分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus、2.1 x 50 mm、1.8 μm (p/n 959741-912)					
カラム温度	25 °C					
注入量	10 μL					
移動相	A = ddH ₂ O B = メタノール					
分析時間	6.0 分間					
流量	0.5 mL/min					
グラジエント表	時間 (分)	0	2.0	5.0	5.5	5.51
	B%	60.0	80.0	100.0	100.0	60.0

Agilent 6150 MSD (シングル四重極) LC/MS システムの条件

ソース	ESI、ポジティブ
乾燥ガス温度	300 °C
乾燥ガス流量	4 L/min
ネブライザ圧力	50 psig
キャピラリ電圧 (正)	4000 V
スキャンモード	SIM

表 4.13 種類のフタル酸エステル類を分離するための LC/MS/MS の条件

LC の実行条件

カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 x 100 mm、1.8 μm (p/n 959758-902)					
カラム温度	50 °C					
注入量	10 μL					
オートサンブラ温度	6 °C					
移動相	A = ddH ₂ O B = メタノール + 5.0 mM ギ酸アンモニウム					
分析時間	10 分間					
流量	0.55 mL/min					
グラジエント表	1260 RRLC					
	時間 (分)	0	5.0	6.0	8	8.1
	流量 (mL/min)	0.2	0.55	0.55	0.55	0.55
	B%	90.0	90.0	95.0	95.0	100.0

Agilent 1290 Infinity LC システム

時間 (分)	0	5.0	8	8.1
流量 (mL/min)	0.2	0.55	0.55	0.55
B%	90.0	90.0	90.0	100.0

Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS/MS の条件

イオンモード	ESI、ポジティブ
乾燥ガス温度	350 °C
乾燥ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
キャピラリ電圧	4000 V
MRM 取り込み	セグメント MRM (セグメント 1 で 0~3.5 分、セグメント 2 で 3.5~8.0 分)
デルタ EMV	50~100 V

サンプル前処理

GC/MS

飲料水サンプルは、台湾の食品工業開発研究所により提供されたものです。紅茶、スポーツドリンク、オレンジジュース、カフェラテの4種類の飲料サンプルは、サンプル前処理メソッドをテストするために小売店から購入しました。従来のヘキサソール抽出の代わりに固相抽出 (SPE) メソッドを使用して、バックグラウンドを低減し、抽出プロセスを高速化しました。5 g の Agilent Chem Elut 吸着剤 (p/n 198003) と、Chem Elut 吸着剤に吸着された 5 mL の水溶性サンプルをガラスカートリッジにロードしました。この吸着剤を 5 mL のジクロロメタンで3回洗浄し、対象化合物を溶出して汚染物質を取り除きました。次に、このサンプルを、分析前に 2.5 mL まで窒素パーズにより濃縮しました。

LC/MS

1 g の飲料、食品粉末、ヘルスケア製品、または焼き菓子サンプルを、45 mL のメタノールで抽出し、20 分間超音波処理しました。抽出後、抽出溶媒を室温に置き (約 25~30 °C)、50 mL フラスコでメタノールでメスアップしました。分析前に 1 mL の抽出溶液を 10 分間遠心分離しました (3,500 rpm)。

分析パラメータ

使用した MS および MS/MS のパラメータを表 5~8 に示します。

表 5. Agilent 5975 GC/MS シングル四重極 SIM 分析パラメータ

番号	化合物	CAS 番号	ターゲットイオン	Q1	Q2	Q3
1	DBP	84-74-2	149	150	223	205
2	BBP	85-68-7	149	91	206	238
3	DEHP	117-81-7	149	167	279	104
4	DNOP	117-84-0	279	149	167	261
5	DINP	28553-12-0	293	149	127	167
6	DIDP	26761-40-0	307	149	141	167

表 6. Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS 分析パラメータ

番号	化合物	定量	
		トランジション*	定性トランジション*
1	DBP	149>65 (30 eV)	149>93 (20 eV) 223>149 (10 eV)
2	BBP	149>65 (30 eV)	149>93 (20 eV) 206>149 (10 eV)
3	DEHP	149>65 (30 eV)	149>93 (20 eV) 279>149 (15 eV)
4	DNOP	279>71 (10 eV)	279>149 (15 eV)
5	DINP	293>71 (10 eV)	293>149 (10 eV)
6	DIDP	307>71 (10 eV)	307>149 (10 eV)

* () 内はコリジョンエネルギー

表 7. Agilent 6150 シングル四重極 LC/MS システムによる 30 種類の
フタル酸エステル類の分析パラメータ

化合物	m/z	Frag V
DMP	195.00	90
DEP	223.00	90
DPRP	251.00	90
DBP/DIBP	279.00	130
DMEP	283.00	130
DPP/PIPP/DIPP	307.00	130
DEEP	311.00	130
BBP	313.00	130
DPHP	319.00	130
DCHP	331.00	130
DHP/BMPP/BOP	335.00	130
DBZP	347.00	130
DHEPP/DIHEPP/HEHP	363.00	130
BBEP	367.00	130
DNOP/DIOP/DEHP/DEHT/DOTP	391.00	130
DNP/DINP	419.00	130
DIDP	447.00	130
DUP	475.00	130

Frag V = フラグメンテーション電圧

表 8. Agilent 6400 トリプル四重極 LC/MS システムによる 13 種類の
フタル酸エステル類の分析パラメータ

化合物	RT (分)	MRM	デュエル タイム (ミリ秒)	フラグ メンタ 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
DMP	0.98	195.1→163	30	57	5
		195.1→91.9			40
		195.1→77			40
DEP	1.05	223.1→177	30	72	1
		223.1→148.9			13
		223.1→65			45
DAP	1.07	247.1→189	50	72	1
		247.1→149			15
DPP	1.18	251.1→191	30	72	1
		251.1→149			9
		251.1→65			53
DBP	1.39	279.2→205.1	30	72	1
		279.2→149			9
		279.2→120.9			37
BBP	1.35	313.2→205	30	72	1
		313.2→148.9			5
		313.2→91			25
DCP	1.84	331.2→167	30	72	9
		331.2→148.9			21
		331.2→120.9			49
DNHP	2.28	335.2→233.1	30	72	1
		335.2→149			9
		335.2→120.9			45
DEHP	3.96	391→279	100	140	5
		391→167			15
		391→149			15
DEHA	4.07	371.3→129	100	104	9
		371.3→111			25
		371.3→55			53
DNOP	4.45	391.3→261.1	50	104	1
		391.3→149			9
		391.3→120.9			53
DINP	5.41	419.3→149	50	104	13
		419.3→71			21
		419.3→57			25
DIDP	6.93	447.3→149	50	104	25
		447.3→85			25
		447.3→71			25

結果と考察

サンプル前処理

GC と LC の両方のメソッドで成功するための鍵の1つとして、バックグラウンドノイズを低減する迅速なサンプル前処理技術があります。ラボ内には、プラスチック製のチューブや容器など、フタル酸汚染の原因が数多くあります。サンプル前処理は、汚染や化学的干渉からのバックグラウンドノイズがない結果を取得するために非常に重要なステップです。中国で、規制 GB21911-2008 に従って食品に含まれるフタル酸エステル類の GC 分析に使用される従来のメソッドの1つに、ヘキサンを使用した液液抽出メソッドがあります。Agilent Chem

Elut 固相抽出カートリッジを使用した代替メソッドは、大幅に容易かつ高速 (10 分未満) であり、さらにコストが低く、フタル酸エステル類暴露による汚染を低く抑えられることができます。図 1 に、Chem Elut を使用したときにはバックグラウンドが従来の液液抽出と比較して低下し、汚染がなくなることを示します。

LC/MS 分析向けに、メタノールと 20 分間の超音波処理を使用した、飲料、食品粉末、ヘルスケア製品、焼き菓子の革新的な抽出メソッドが台湾 FDA により作成されました。このメソッドの定量性を確保するために、サンプル前処理の前に内部標準を添加しました。

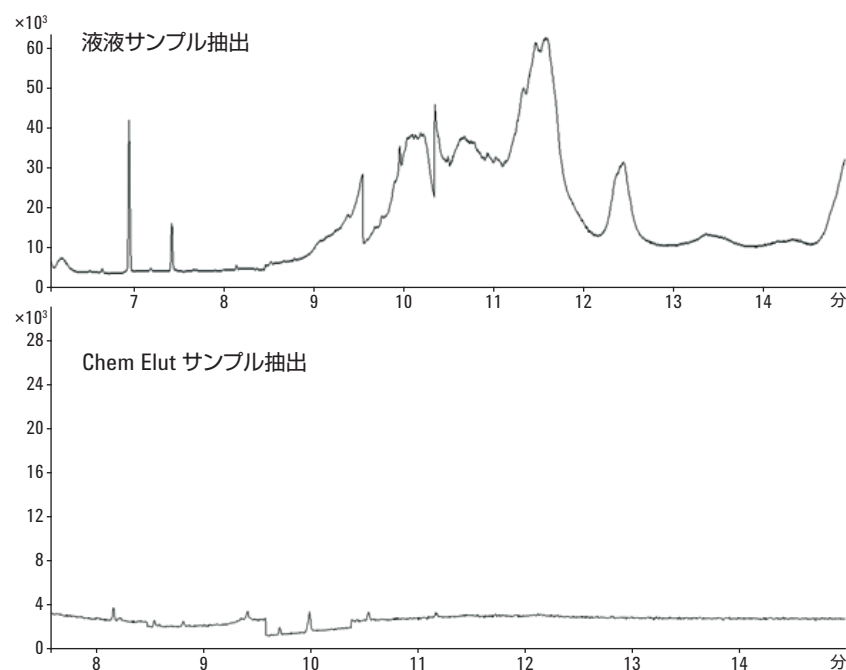
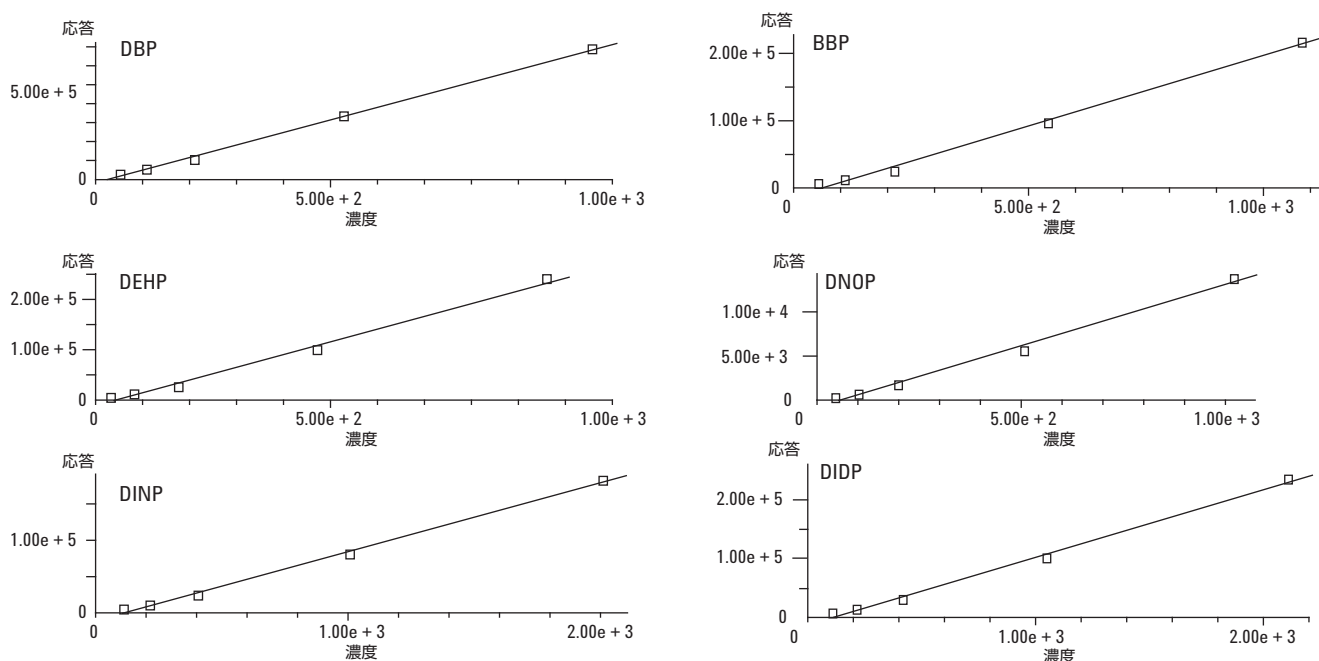


図 1. 液液サンプル抽出 (上) および Chem Elut サンプル前処理手順 (下) を使用した GC/MS サンプル実行後のブランク注入の比較。サンプル分析後のブランク注入で、液体抽出ブランクに大きなキャリーオーバーが見られることに注目してください。Chem Elut で前処理したブランクにバックグラウンドではキャリーオーバーがほぼ見られない点と比較してください。ここでは、同様にサンプル前処理を行った後に 1 回だけブランクを注入しています

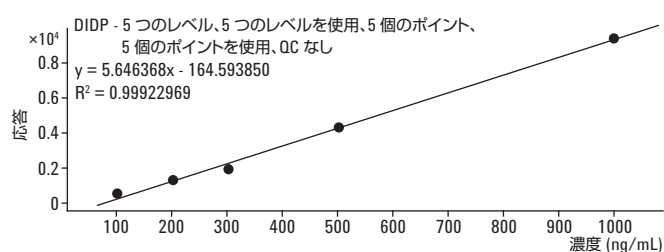
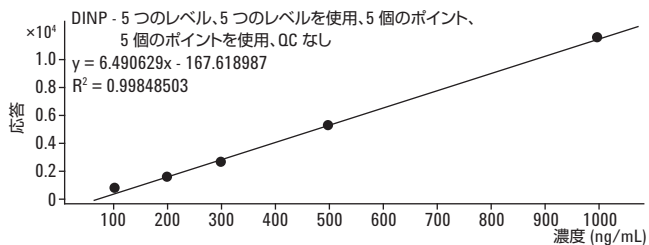
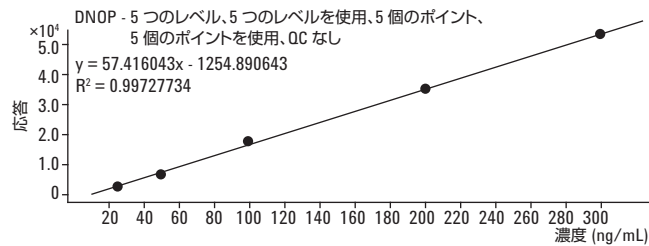
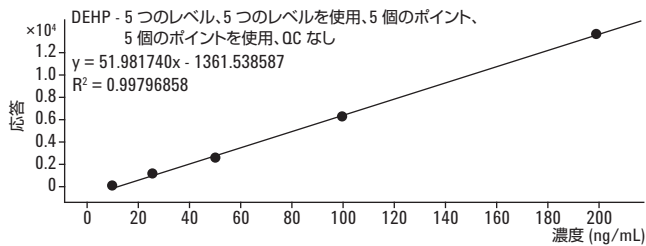
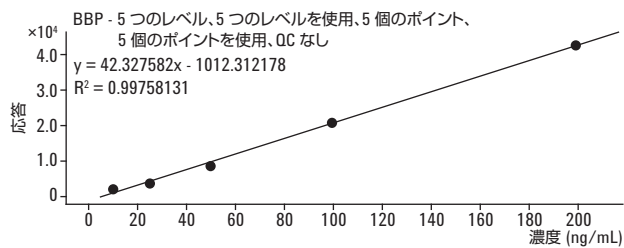
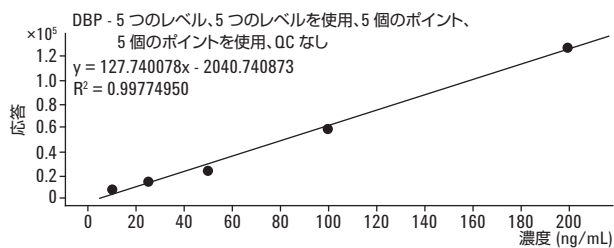
定量の感度および直線性

GC/MS および GC/MS/MS メソッド感度について示します。中国 (GB21911-2008) および台湾のフタル酸エステル類の規制では、食品中の任意のフタル酸エステル類のレベルが 1 ppm を超えてはならないことを求めています。シングル (MSD) またはトリプル四重極 MS プラットフォームを使用すると、感度の範囲が 50~100 ppb となり、定量の直線性 (R^2) が 0.992 以上になります (図 2 および 3 を参照)。中国および台湾での規制に GC および GC/MS は十分な性能を有しています。



化合物	直線性の範囲 (mg/L)	相関係数 (R^2)
1 DBP	0.05 - 1	0.998
2 BBP	0.05 - 1	0.996
3 DEHP	0.05 - 1	0.992
4 DNOP	0.05 - 1	0.992
5 DINP	0.1 - 2	0.997
6 DIDP	0.1 - 2	0.996

図 2. Agilent 5975 シリーズ GC/MS の SIM /スキャン同時取り込みモードによる、6 種類の最も重要なフタル酸エステル類の検量線と、直線性の範囲および相関係数の例



化合物	直線性の範囲 (mg/L)	相関係数 (R ²)
1 DBP	0.05 - 1	0.998
2 BBP	0.05 - 1	0.998
3 DEHP	0.05 - 1	0.998
4 DNOP	0.05 - 1	0.997
5 DINP	0.1 - 2	0.999
6 DIDP	0.1 - 2	0.998

図 3. Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS システムのMRM モードによる、6 種類の最も重要なフタル酸エステル類の検量線と、直線性の範囲および相関係数の例

図 4 に示すように、GC/MSD プラットフォームは再現性も優れています。図 5 で 15 種類のパタル酸エステル類の分離について示したように、Agilent 5975 GC/MS の重要な機能は、SIM およびスキャンデータを同時に提供する機能です。この機能は定性能力が高いため、偽陽性が発生する確率が下がります。

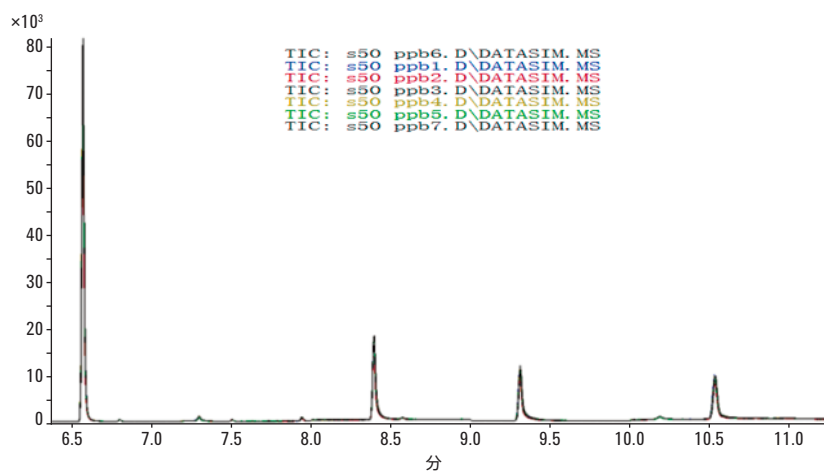


図 4. 規制されている 6 種類のパタル酸エステル類を 0.05 mg/L (50 ppb) で 6 回注入したときのトータルイオンクロマトグラム (TIC) トレースの再現性。6 回のすべての分析はほぼ同一です

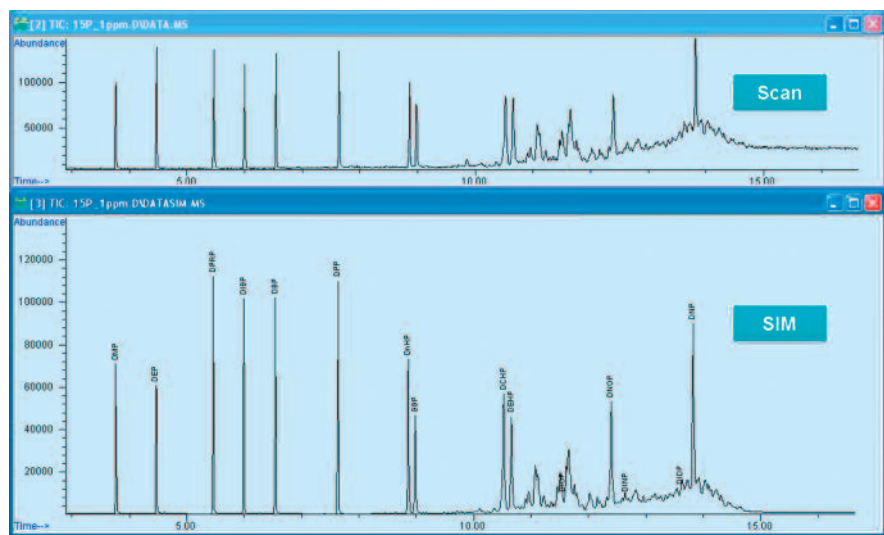


図 5. 15 種類のパタル酸エステル類混合物の GC/MS による SIM/スキャン同時取り込み分析例

30 種類 of フタル酸エステル類を同時に分析する LC/MS メソッドにより、メタノールで 50~500 ppb の機器検出下限が得られます。LC/MS/MS メソッドは、図 9 に示すように ($\mu\text{g}/\text{mL}=\text{ppb}$)、台湾 FDA で規定された 20 ppb を十分に下回る機器検出下限 (IDL) を提供し、定量の R^2 値は、13 種類のフタル酸メソッドを使用したときにすべて 0.9947 以上となりました (抽出イオンクロマトグラムを図 6 に示します)。特に DIBP および DBP の 14 種類のフタル酸化合物の同位体を分離できる、C18 カラムを使用した LC/MS/MS メソッドも開発されています (ここではデータを示していません)。

表 9. LC/MS/MS による 13 種類のフタル酸エステル類分析の機器検出下限

化合物	R^2	IDL ng/mL (S/N > 10)
DMP	0.9955	2
DEP	0.9968	3
DAP	0.9947	0.3
DPP	0.9983	0.5
DBP	0.9949	5
BBP	0.9962	0.5
DCP	0.9981	0.3
DNHP	0.9981	0.5
DEHP	0.9949	5
DEHA	0.9972	0.5
DNOP	0.9979	0.5
DINP	0.9993	5
DIDP	0.9998	5

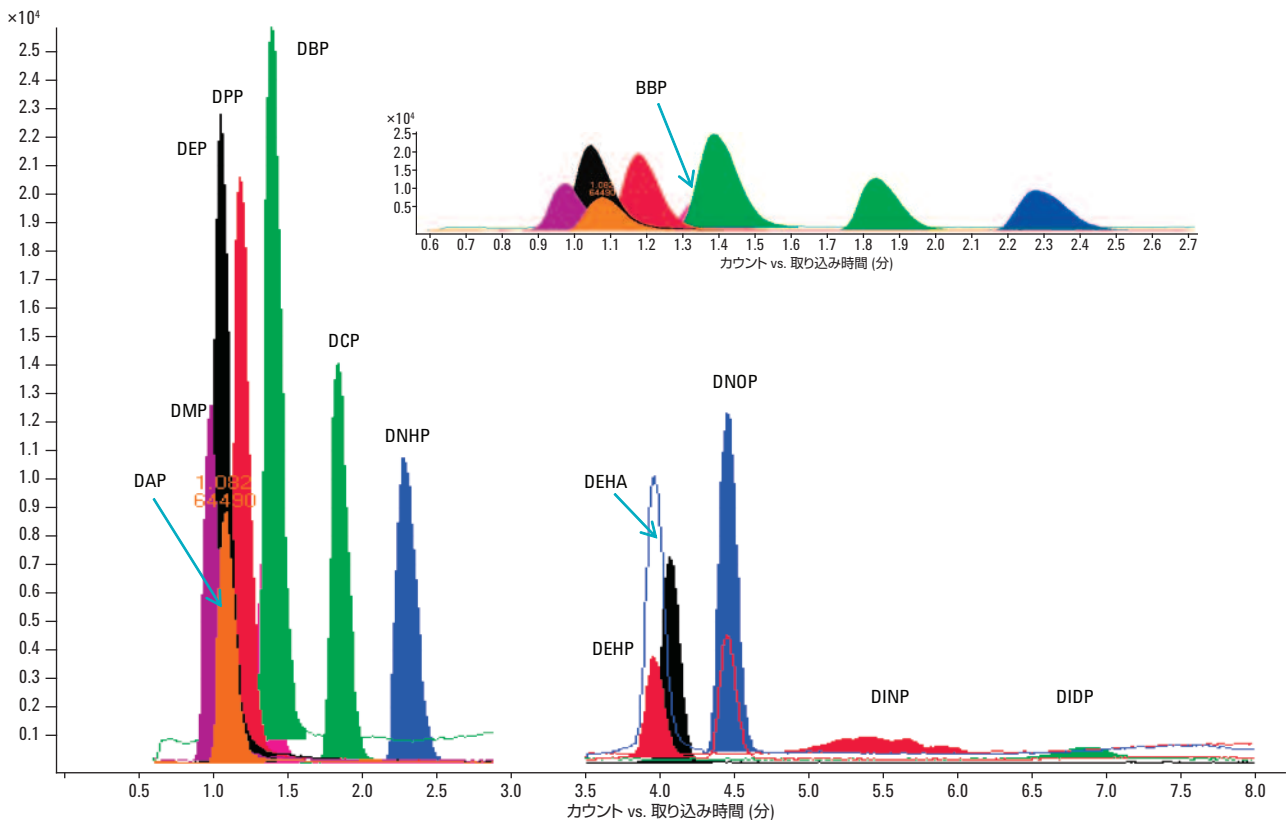


図 6. LC/MS/MS を使用して 13 種類のフタル酸エステル類を分離したときの抽出イオンクロマトグラム (EIC) トレース

サンプルテストの結果

小売店から購入した 3 種類の飲料サンプルを、開発した GC メソッドを使用して試験しました。GC/MS テストの結果を表 10 に示します。サンプル SN1874 中の DINP のレベルと、サンプル SA2549 中の DEHP、DINP、DNOP のレベルは、中国と台湾で指定された限界値 (1 ppm) を超えています。実際に、サンプル 2549 中の DINP のレベルは、許容限界値の 100 倍以上です。

スポーツドリンクサンプルでも、LC/MS/MS を使用して数種類のフタル酸エステル類を分析しました。マトリックスの検量線は、DEHP 標準をスポーツドリンクにスパイクし、サンプル前処理メソッドを使用して抽出することで作成しました (図 7)。この検量線を使用して、別のスポーツドリンクサンプルに含まれる DEHP を定量しました。クオリファイアイオンの比は、2 つのクオリファイアイオンについて 1.7 および 2.0 であり、DEHP 標準の同定基準に合致しています。スポーツドリンクに含まれる DEHP 濃度の測定値は 1.05 ppm で、台湾 FDA の上限値である 1 ppm をわずかに上回っていました。

表 10. 3 種類の飲料サンプルの GC/MS による分析結果

	DEHP (mg/L)	DINP (mg/L)	DNOP (mg/L)
SN610	ND	ND	ND
SN1874	ND	2.13	ND
SA2549	72.5	137	19.0

ND = 不検出

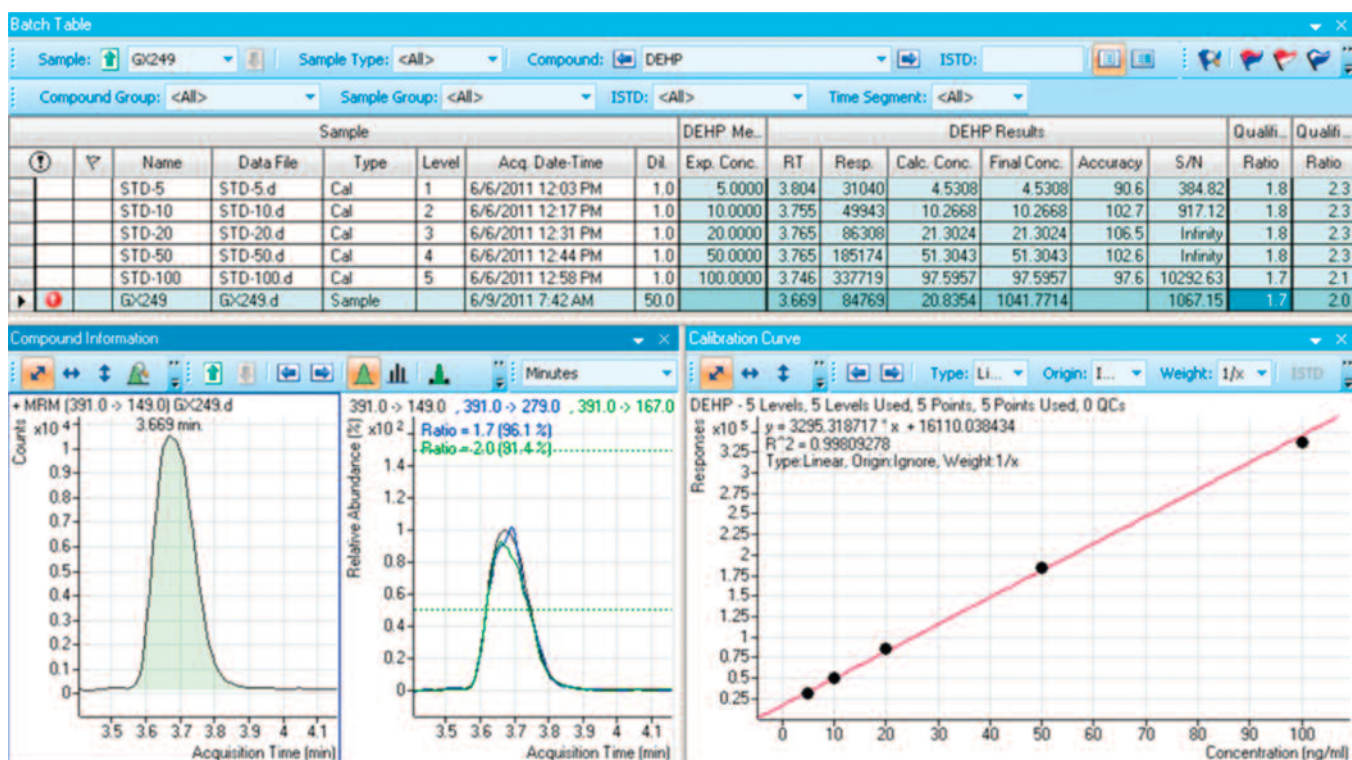


図 7. スポーツドリンクサンプルにスパイクした DEHP の LC/MS/MS 検量線

結論

アジレントは、GC/MS、LC/MS の両 MS プラットフォームで、30 種類の全フタル酸エステル類と EU および米国で厳しく規制されている低レベルの 6 種類の化合物について、フタル酸エステル類の測定で要求される迅速な検出および定量のためのメソッドを開発しました。Agilent GC/MS および LC/MS システムの汎用性と機能によって、食品安全性に関する新たな危機への迅速な対応が可能になります。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

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。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

December 8, 2011

5990-9510JAJP



Agilent Technologies