

食品に使用される器具・容器包装における 合成樹脂抽出物分析とアプローチ



Agilent Technologies

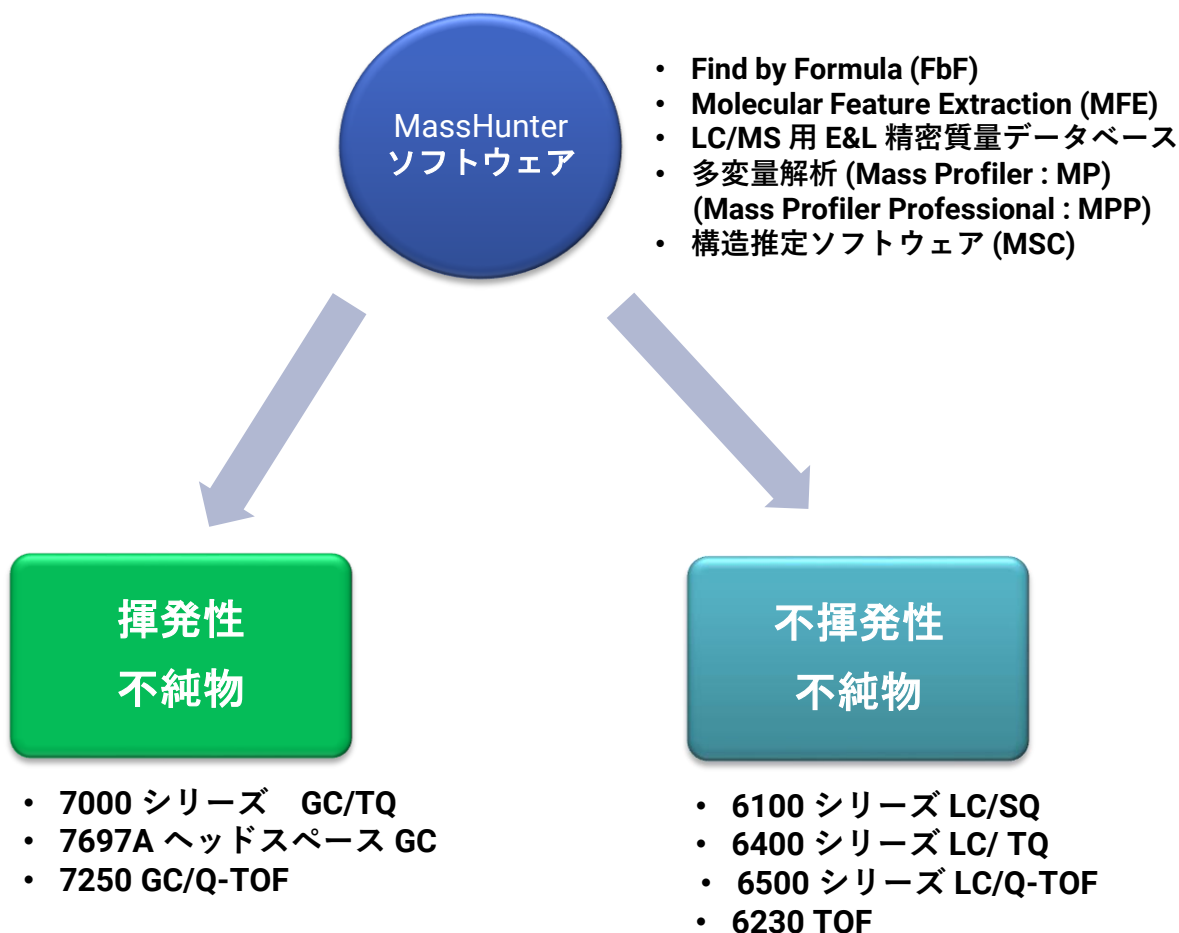
Agilent の食品用器具・容器包装からの抽出物分析のためのソリューション

アジレントは器具・容器包装からの抽出物分析をサポートします

食品用器具・容器包装の製造等における安全確保に関するガイドラインが発表され、平成30年度に向けて器具・容器包装に用いられる化学物質の規制としてポジティブリスト制度が推進されようとしています。アジレントでは、これら化学物質の分析に対し、前処理から分析までの包括的ソリューションを提案すると共に、それらアプローチを紹介しています。この資料は、その参考資料として作成されたものです。

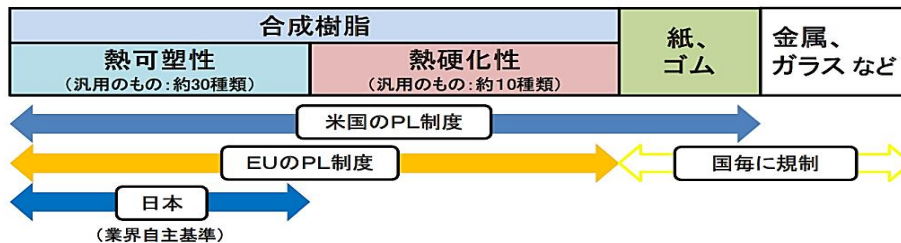


食品用器具及び容器包装のための抽出物分析ソリューション



合成樹脂の規制とリスク評価手順の概要

◆ 日本と欧米における規制の比較



○米国：ポジティブリスト制度

合成樹脂及び紙・ゴムについて、1958年から連邦規則集に掲載された化学物質のみが使用できるポジティブリスト制度。合成樹脂については、ポリマーの種類ごとに、使用可能なモノマー、添加剤やその含有量が規定。これに加え、2000年から、承認の迅速性を図るため、個別製品ごとに申請者に限定して使用可能とする制度（上市前届出制度（FCN））が新設された。原材料事業者を含め、適正製造規範（GMP）のもとで製造されることが要求されているが、事業者間の情報伝達に関する特段の規定はなく、自主管理・自己宣言に任されている。

○欧州（EU）：ポジティブリスト制度

合成樹脂について、2010年からポジティブリスト制度。モノマー、添加剤ごとに、溶出量や使用条件等が規定されている。また、製品及びその材料を構成する成分の総溶出量についても規定されている。原材料事業者を含め、適正製造規範（GMP）に従った製造を義務づけるとともに、事業者間の情報伝達のため、適合宣言書の製品への付帯が義務づけられている。

○日本：食品衛生法ではネガティブリスト制度

これに加えて、熱可塑性樹脂に関しては、三衛協による自主基準（化学物質約1,500種のポジティブリストと衛生試験法）と自主基準への適合性を証明する確認証明制度が設けられている。

厚生労働省実施「食品用器具及び容器包装の規制に関する検討会」の進捗報告より参照

日本もポジティブリスト制度化への移行が検討されている

◆ 合成樹脂のリスク評価手順の概要

1. 情報収集及び有害物質の選出

原料モノマー、添加剤、合成樹脂から抽出する可能性のある物質情報を調査する。

2. 抽出条件の検討

実際の食品を用いて抽出条件を検討すると分析法が複雑になり、困難を要する。そのため、食品疑似溶媒を設定し、抽出条件を検討する。

3. 暴露（摂取）量の推定

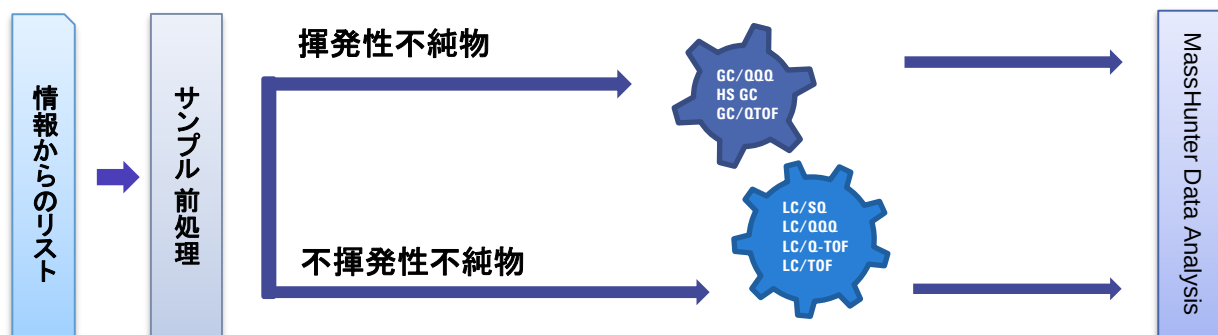
- ・評価対象物質の特定
- ・抽出量の測定
- ・食事量から摂取量を算出する

4. 毒性の評価

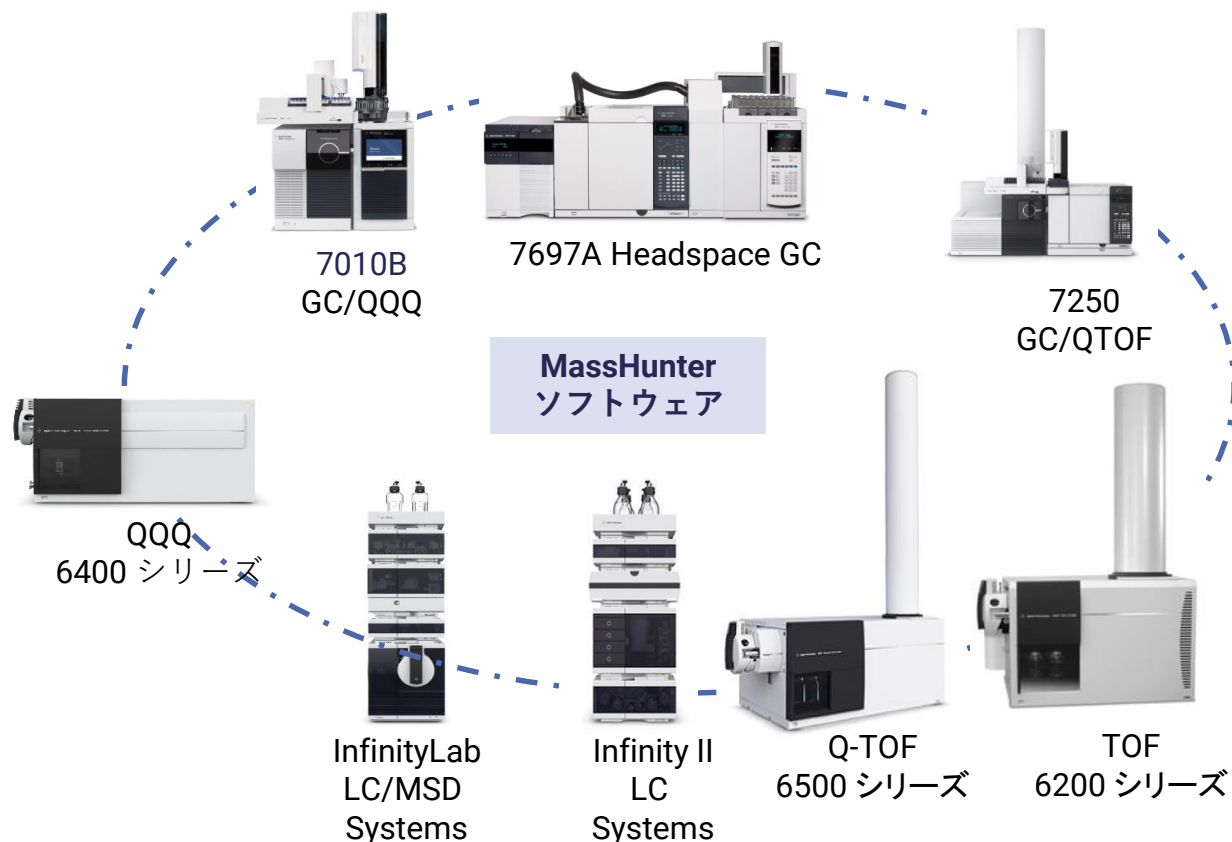
- ・暴露量（または抽出量）に応じた毒性データを実施
- ・毒性データからリスクを評価

抽出物分析の進め方

1. 情報収集にて得られた情報をもとに抽出される可能性のある化合物リストを作成する。
2. 対象となる物質（抽出物）を揮発性不純物、不揮発性不純物に分類する。
3. 試験品からリスト化合物が最大の抽出ができる条件を検索し、前処理等を含めた実験計画をおこなう。
4. 揮発性不純物は、7000シリーズ GC/TQ、7697A ヘッドスペース GC、7250 GC/Q-TOF 等で分析する。
5. 不揮発性不純物、6100 シリーズ SQ、6400 シリーズ TQ、6500 シリーズ Q-TOF、6230 TOF 等で分析する。



食品用器具・容器包装分析のためのアジレントの包括的なポートフォリオ



抽出条件の検討および分析ソリューションの使い分け

◆食品疑似溶媒：

実際の食品を用いると前処理が複雑になり、分析法も難しくなる。定量限界も高くなってしまい、正しい評価をするのが難しくなるなどの理由から食品疑似溶媒が設定されている。

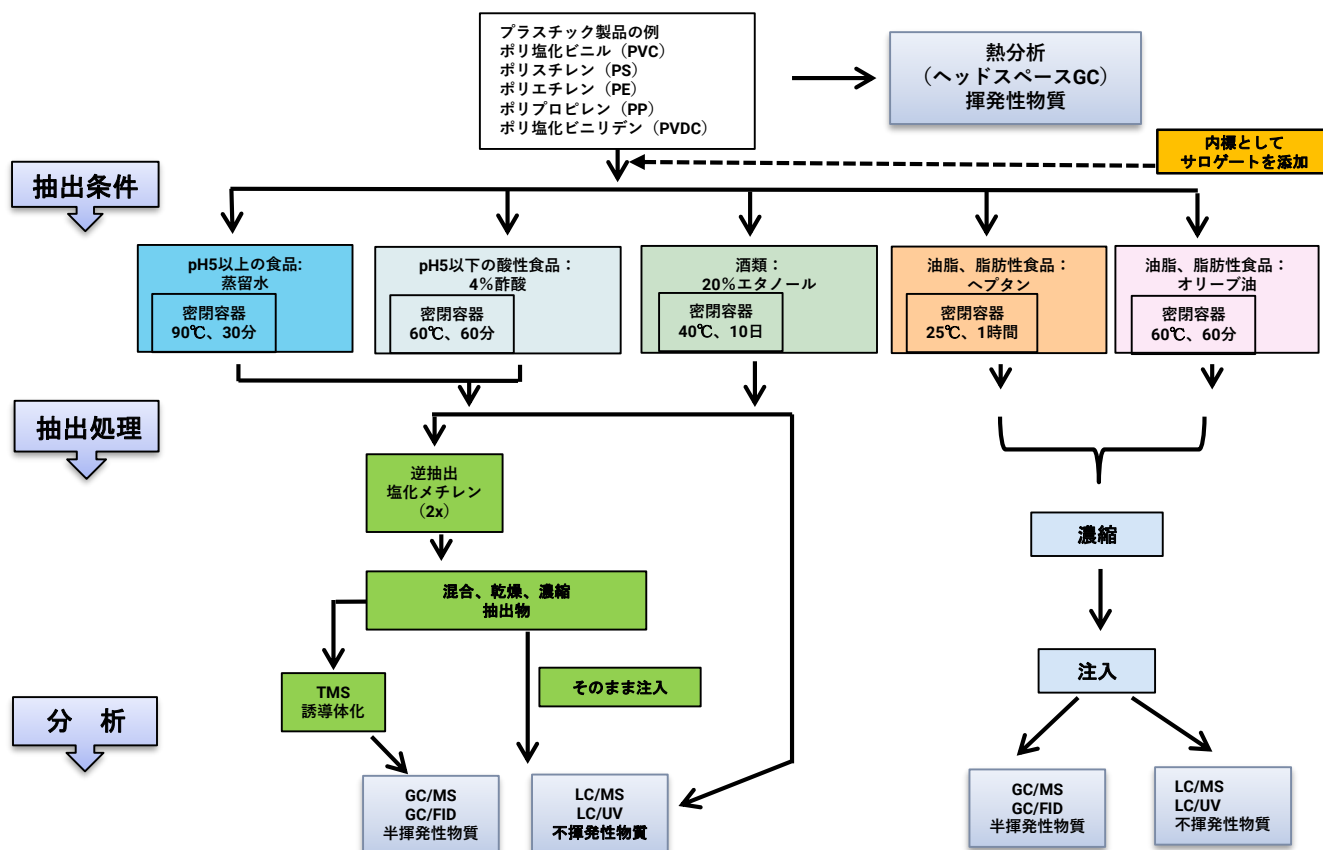
- pH5以上の食品：蒸留水
- pH5以下の酸性食品：4%酢酸
- 酒類：20%エタノール
- 油脂および脂肪性食品（脂肪分20%以上）：ヘプタン*

*ヘプタンは溶出力が強く油脂及び脂肪性食品の溶出傾向を反映していないことからオリーブ油などの植物性油脂用いる方法が厚生労働科学研究において検討

抽出条件:

- 40℃×10日（常温保存）
 - 60℃×60分（70℃以下）
 - 90℃×30分（100℃以下）
 - 110℃×10分（100℃以上）
- など食品を考慮した最適な抽出条件を選択する。

抽出手順と分析ソリューションの使い分け例



サンプル前処理と抽出/濃縮

◆ 熱抽出

GC/MS用ヘッドスペース:

サンプルを加熱し、そこから得られる揮発性物質を測定する。

アジレント 7697A ヘッドスペースサンプラ



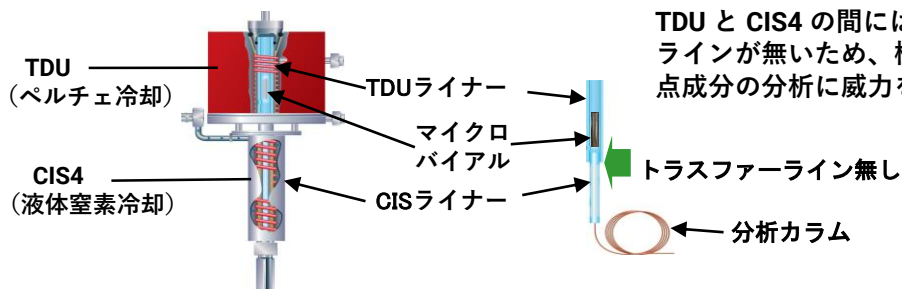
ゲステル社 動的・静的ヘッドスペースサンプラ



ゲステル MPS2



TDUはCIS4 の上に
に直接装着



TDU と CIS4 の間にはトランスファーラインが無い
ため、極性成分や高沸点成分の分析に威力を発揮

サンプル前処理と抽出/濃縮

◆ 液抽出

GC/MS用 Twister : スターバー抽出 (SBSE) を利用

SBSE とは、Stir Bar (攪拌子) に100% PDMS (ポリジメチルシロキサン) をコーティングさせた GERSTEL 社製 Twister を試料溶液中で攪拌させて目的成分を抽出する技術の事で、液-液分配の原理を応用した手法です。

ゲステルTDUにて Stir Bar を加熱して抽出物を GC/MS に導入します。



Stir Bar

SBSE の操作フロー

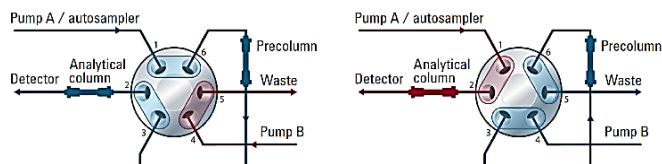


LC/MS用 iChemExplorer

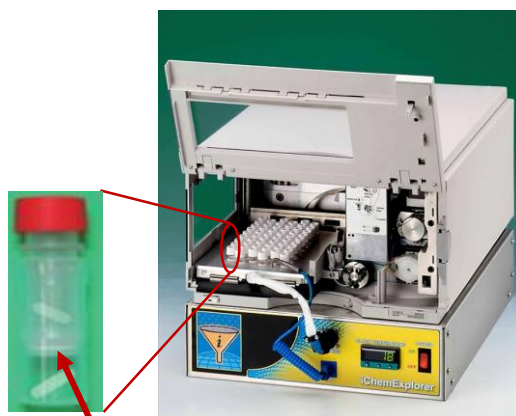
iChemExplorerは 2 ml バイアル、6 ml バイアルに最大 150℃まで加温可能で攪拌子を入れて抽出します。抽出物はアジレントオートサンプラでLC/MS に導入します。

サンプルクリーンアップ (2-position / 6port バルブ)

また、マトリックスをプレカラムに吸着させながら化合物を分析カラムで分析し、次の分析の前に2-position / 6 portバルブを切り替えてプレカラムを逆方向から洗浄することで、再現性や堅牢性が向上します。



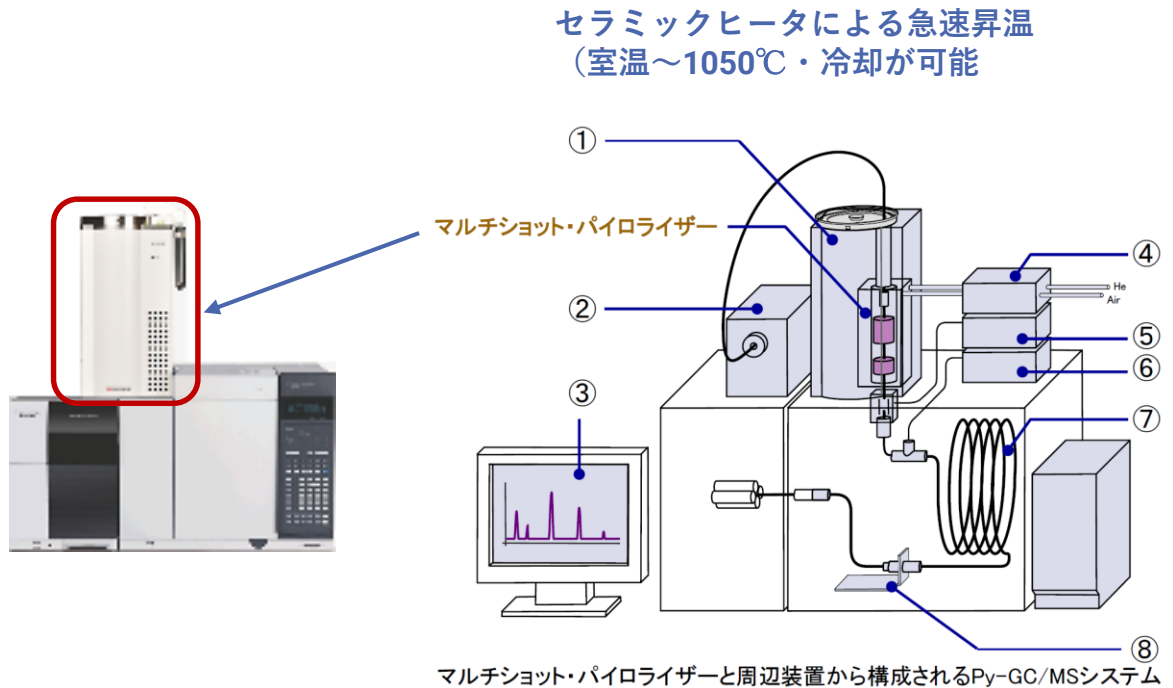
iChemExplorer



フィルタ
材質:PTFE、PVDF

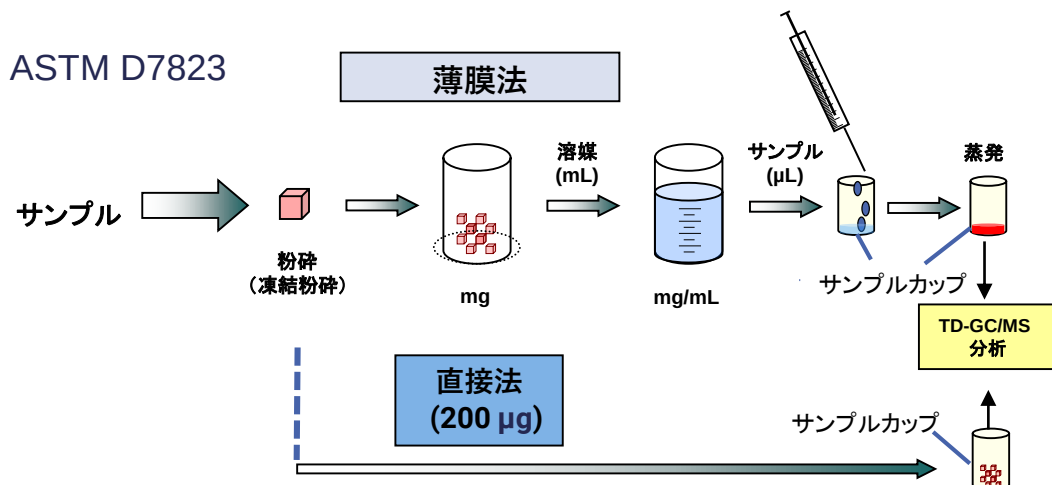
サンプル前処理と抽出/濃縮

◆ マルチショットパイロライザーGC/MS



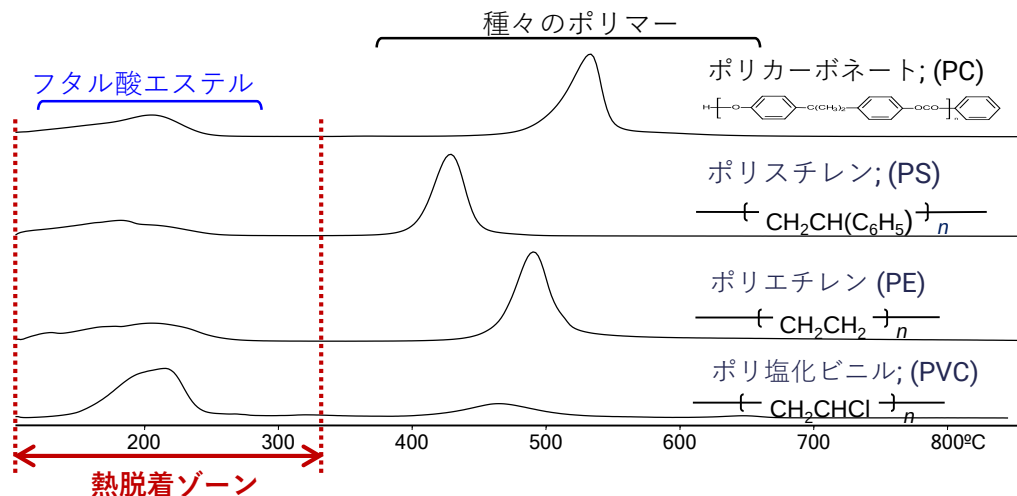
サンプル調整と誤差

薄膜法では作業工程で多くの時間と誤差を生じますが、直接法では最小減にすることができます。
また、コスト面でも有効です。



マルチショットパイロライザーGC/MSを使用した塩化ビニルポリマー中のフタル酸エステルの分析

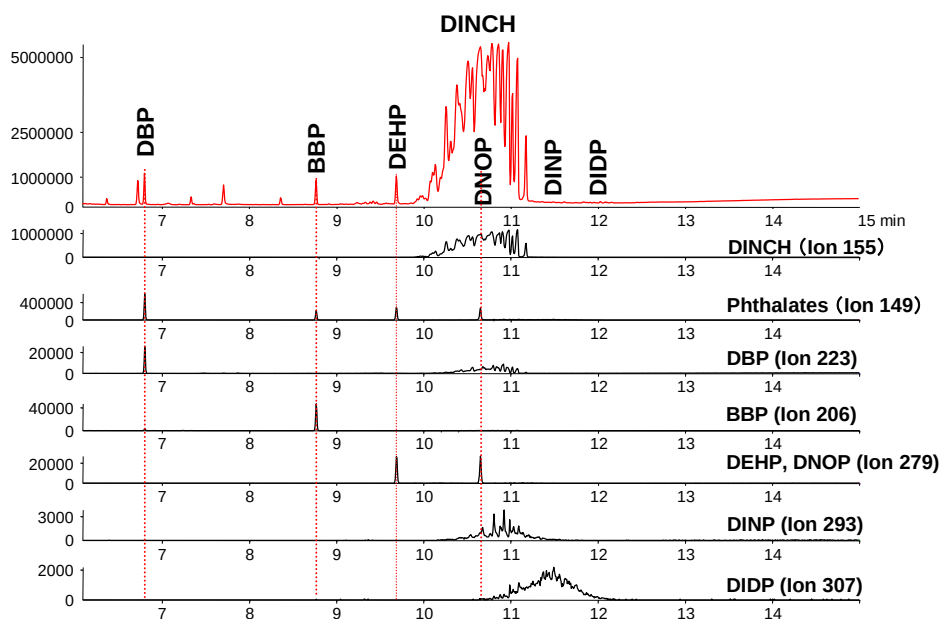
◆ 4種類のポリマーのフタル酸エステルの熱脱着ゾーン



フタル酸エステルの熱脱着ゾーンはすべてのポリマーについて同様に100℃～320℃であることがわかります。

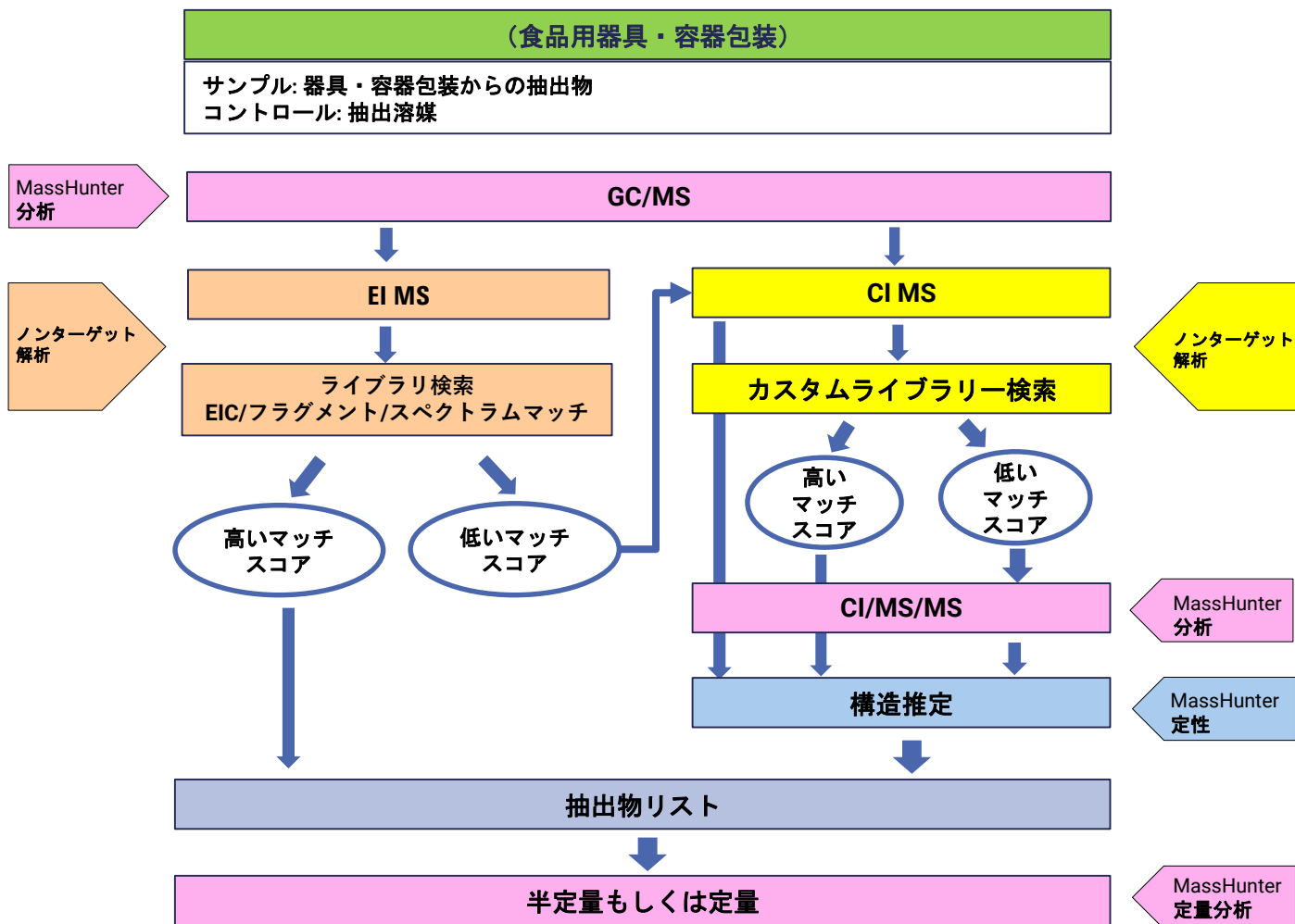
◆ 塩化ビニルポリマー中のフタル酸エステルの分析

PVC/DINCH (Di-IsoNonyl-CycloHexane-dicarboxylate) のTD-GC/MS分析。フタル酸エステルはその相対保持時間とフタル酸エステル特有のイオンの存在から定性した。ASTM D7823に記載の薄膜法によるサンプル調製法を使用した。

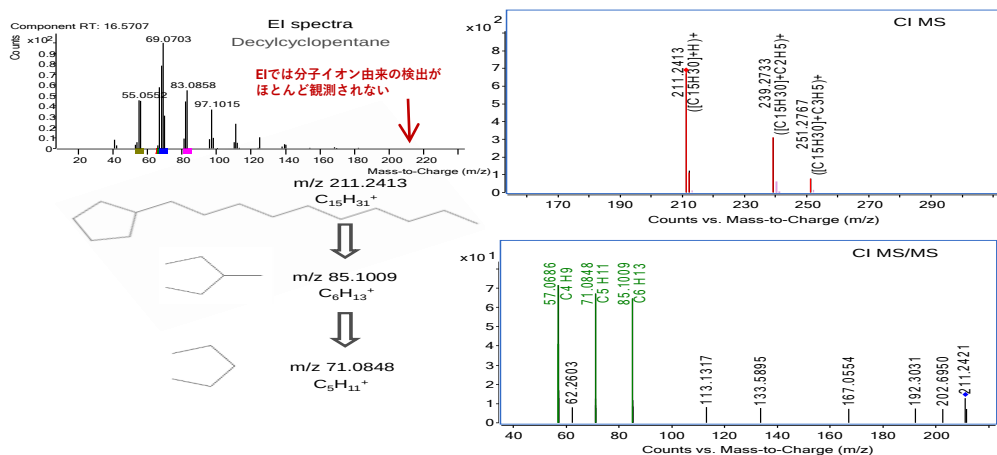


フタル酸名	省略形
Dibutyl phthalate	DBP
Benzyl butyl phthalate	BBP
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP
Di-n-octyl phthalate	DNOP
Diisononyl phthalate	DINP
Diisodecyl phthalate	DIDP

GC/MS によるノンターゲット/ターゲット分析ワークフロー



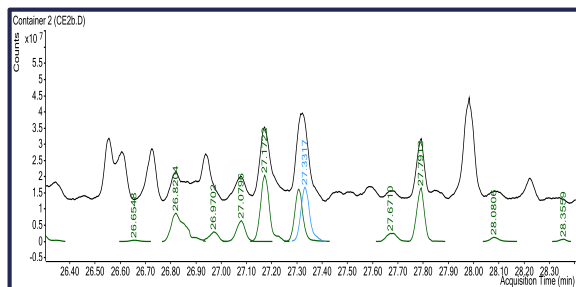
◆ EI (電子イオン化) と CI (化学イオン化) の違いと CI のメリット



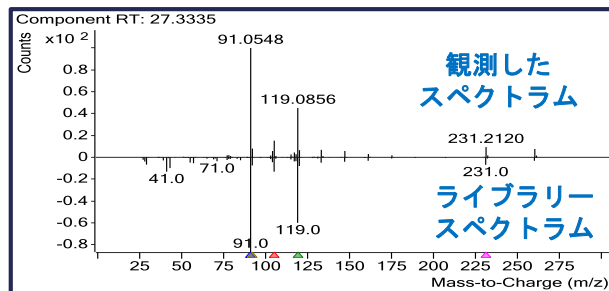
CIでは分子イオン由来の質量が観測され、同定の確認材料になるさらにCI/MS/MSを行えばそれらのフラグメントから構造決定のための情報が得られる

ライブラリ検索 EIC/フラグメント/スペクトラムマッチ

1. ノンターゲット化合物のデコンボリューション



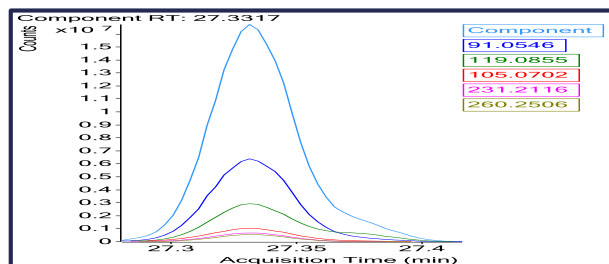
2. ノンターゲット化合物のスペクトラムのライブラリ検索（ミラーリング）



3. 結果抽出リスト

Component RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#
27.0796	Heptadecane, 3-methyl-	81.6	C18H38	6418-44-6
27.1722	Heptadecane, 3-methyl-	86.7	C18H38	6418-44-6
27.3067	Phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester	84.2	C19H28O4	1000356-78-3
27.3317	Benzene, (1-ethylundecyl)-	85.3	C19H32	4534-52-5
27.6710	Heneicosane	83.9	C21H44	629-94-7
27.7912	Nonadecane	88.2	C19H40	629-92-5

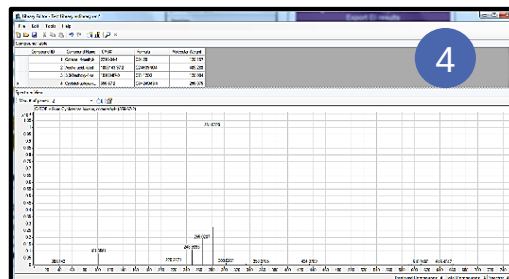
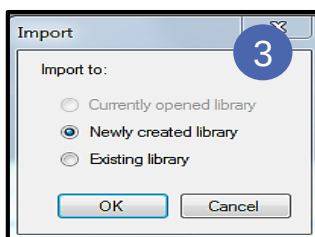
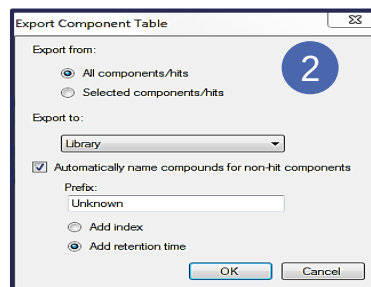
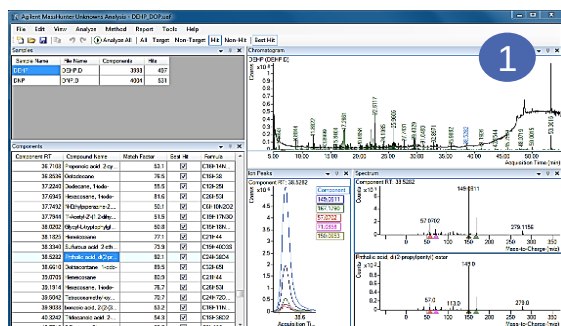
4. 化合物と各イオンピークの重ね書き



☆ ノンターゲット抽出物はEI NIST 14.0によって, Benzene (1-ethylundecyl) と同定

◆ GC/MS個人用ライブラリーの作成

4ステップで新規化合物のライブラリー登録も簡単にできます



LC/MSによるノンターゲット分析のワークフロー

目的:

情報収集より得られたリストを基にノンターゲット化合物として主に抽出物または浸出物を下記のステップにより同定します。

最終的に期待される貯蔵条件および予想される貯蔵期間中に観察された浸出物ターゲット化合物として半定量もしくは定量します。

STEP1

分析



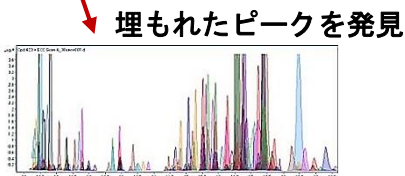
LC/Q-TOF測定

- MS フルスキャン
- MS/MS 分析

STEP2

化合物ピークの自動抽出

- ◆ **Molecular Feature Extraction¹⁾**にてピーク抽出



STEP3

データベース検索

- ◆ **LC/MS用E&L精密質量データベースライブラリ (PCDL)²⁾**にて検索

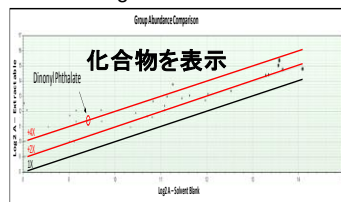
Rank	Name	Formula	Mass	RT	MS	MS/MS	MS/MS
1	1,2-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100
2	1,1-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100
3	1,2-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100

STEP4

差異解析

- ◆ 差異解析ソフト **Mass Profiler³⁾**

Fold Change=強度の平均値の差

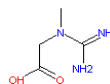


- ◆ 多変量解析ソフト **Mass Profiler Professional⁴⁾**

STEP5

化合物推定

- ◆ **Molecular Formula Generation⁵⁾**にて、各化合物の分子式の推定
ChemSpiderにてサーチ



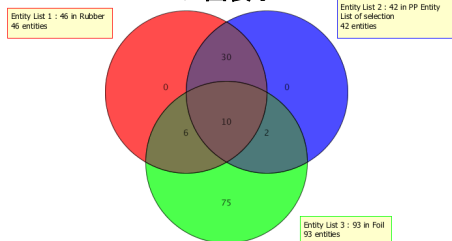
STEP6

構造推定・決定

- ◆ **MS/MS分析にてフラグメント確認し Molecular Structure Correlator(MSC)⁶⁾**にて構造解析

Rank	Name	Formula	Mass	RT	MS	MS/MS	MS/MS
1	1,2-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100
2	1,1-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100
3	1,2-Dichloroethane	C ₂ H ₄ Cl ₂	99	1.1	100	100	100

ベン図表示



LC/MSによるターゲット分析のワークフロー

STEP1

分析

Q-TOF測定
MSモード



All Ions MS/MS 分析 ⁷⁾

STEP2

スクリーニング(ピーク検出)

◆ データベースをもとにピーク抽出を行う。

Find by Formula (FbF) 機能 ⁸⁾

- ・質量精度
- ・同位体ピークパターン
- ・RT(情報があれば)に基づき、各化合物に対し、判定スコアが表示される

Name	Formula	Mass	Score	RT	Score	Score	Score	Score	Score
Trifluoromethylbenzene	C ₇ H ₅ F ₃	181.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Trifluoromethylbenzene	C ₇ H ₅ F ₃	181.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Trifluoromethylbenzene	C ₇ H ₅ F ₃	181.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Trifluoromethylbenzene	C ₇ H ₅ F ₃	181.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Trifluoromethylbenzene	C ₇ H ₅ F ₃	181.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

STEP3

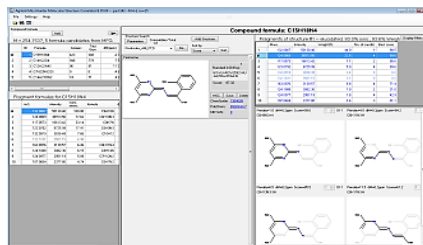
スクリーニング(ピーク判定)

◆ ターゲットMS/MS測定

・ LC/MS用E&L精密質量データベースライブラリ (PCDL) ²⁾

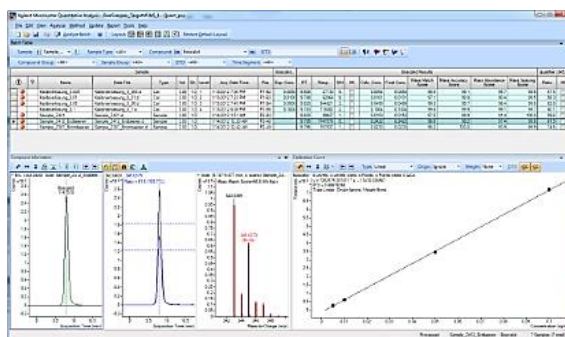
によるMS/MSスペクトル検索

・ 化合物構造推定支援ソフト (MSC)によるスコア判定



STEP4

精密質量定量

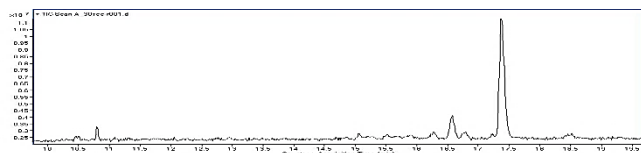
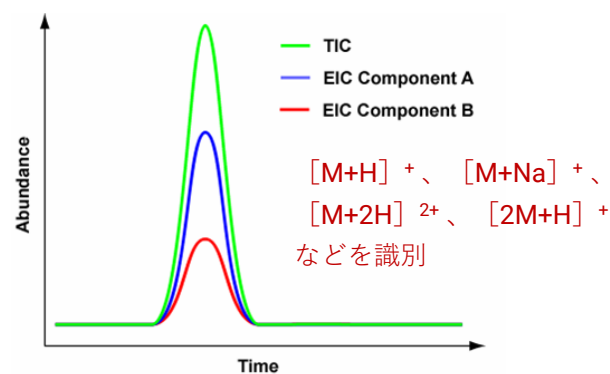
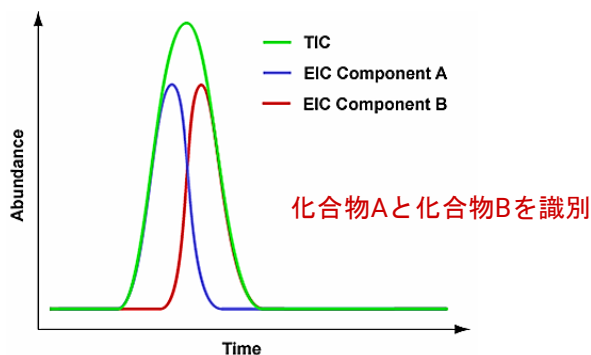


1) Molecular Feature Extraction (MFE)

自動で生データの中からクロマトピークを見つける機能

データは独自開発の分子特徴検出アルゴリズムによって処理されます。

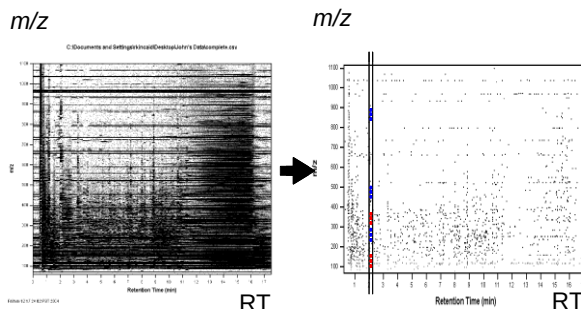
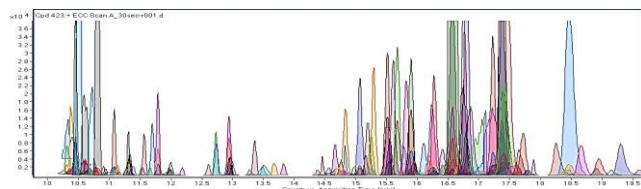
- クロマトグラフィックピークの検出
 - 関連しているすべてのイオンを検索
 - +Hや+Na、+Kなどの付加イオンを全て一つの特徴にまとめます。
 - M+1やM+2などの同位体イオンを全て一つの特徴にまとめます。
 - 同じMから生じた異なる価数のイオンを一つの特徴にまとめます。
 - 二量体、三量体をチェックします。
 - 抽出化合物クロマトグラム (ECC)を作成します。
- 全てのイオン強度を足し合わせ、一つの特徴としての強度に表します。
- 完全に自動化されたデータ処理機構です。
- 生成される化合物リストはエクスポート可能です。
- MassHunter定性解析ソフトウェアの標準機能です。



Molecular Feature Extraction (MFE)

- 埋もれた複数のピーク、共溶出ピークを検出
- それぞれの時間・質量・強度の情報をまとめた一覧表を作成

情報抽出後



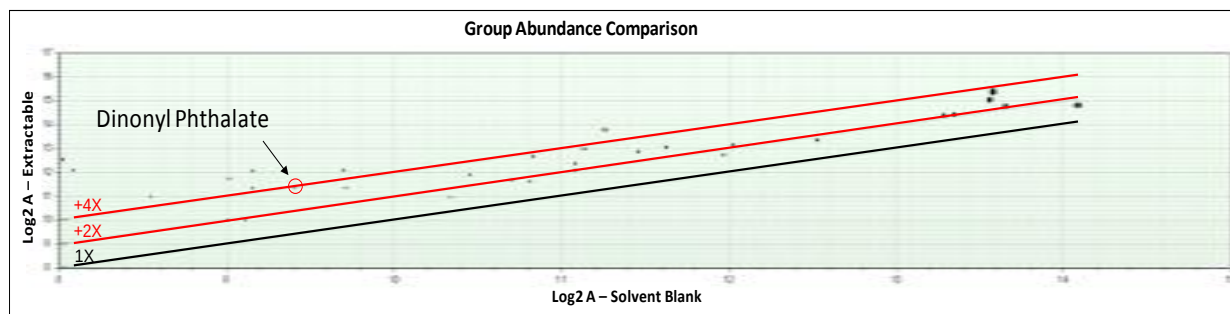
情報抽出後

3) Mass Profiler (MP)

4) Mass Profiler Professional (MPP)

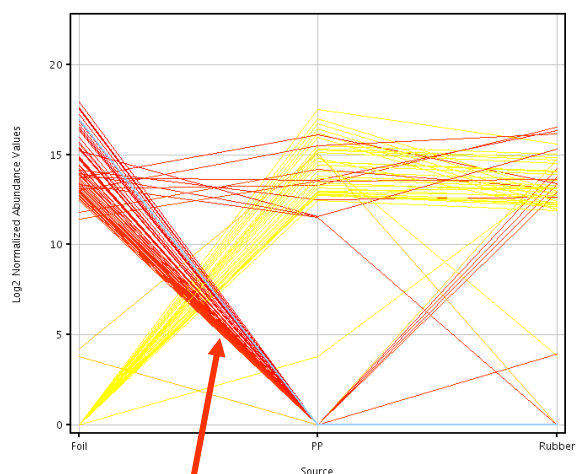
倍数変化による差異解析 (Fold Change) :

抽出物が溶媒ブランクと比較して、1 倍、2 倍、および 4 倍の強度となる差異を見つけることができるもので、対数プロットで表示される。



差異を示す化合物は、ブランクと比較して有意に高い存在量で見出される化合物であるジノニルフタレートは、抽出可能なサンプルと溶媒ブランクと比較してサンプルにおいて > 2 倍の強度を示し、有意であると分類された。

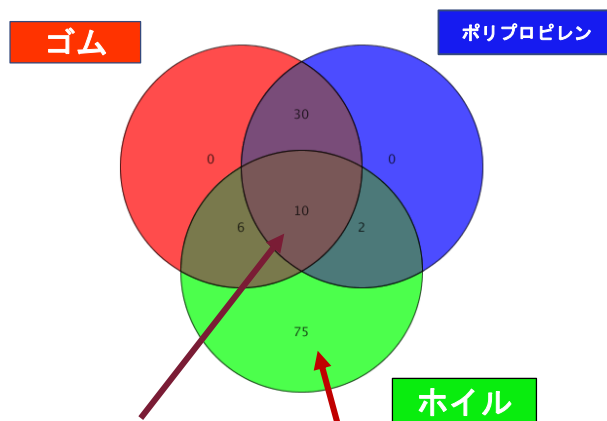
クラスタ分析



ホイル ポリプロピレン ゴム

ホイルに特徴的な化合物が観測されていることがわかる

ベン図表示



材質に限らず共通の化合物

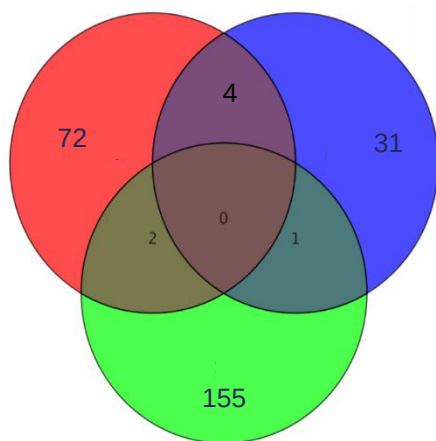
ホイル特有の化合物が多く観測されている

4) Mass Profiler Professional (MPP) (つづき)

◆ クロスする技術の比較

GC/MS (CI)

LC/MS



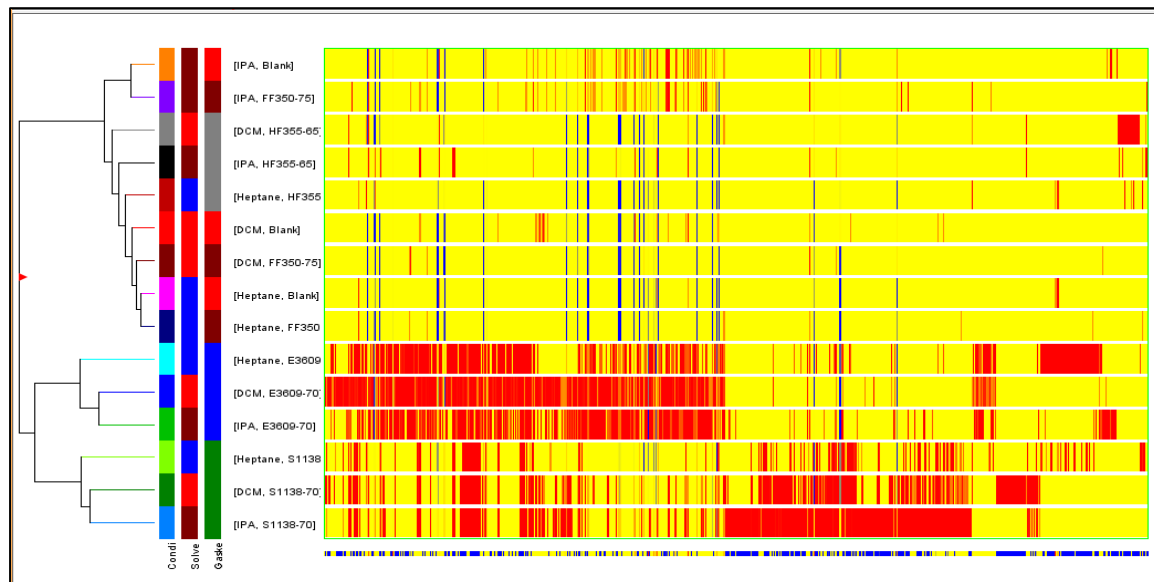
MPPによるベン図表示を利用することでそれぞれの条件から導き出された化合物の分布が一目で確認ができます。

◆ ノンターゲットスクリーニング: 未知物質の発見

クラスタ分析

4つの異なるガasketをジクロロメタン、イソプロピルアルコールおよびヘプタンで抽出しました。

多変量解析では、各ガasket内の化合物の差異を調べることができ、化合物を明らかにします。



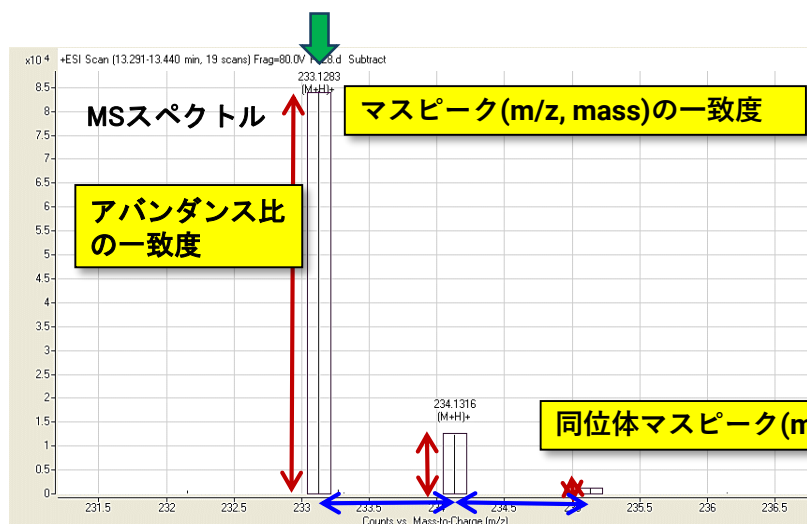
5) Molecular Formula Generation (MFG)

同位体ピークパターン的一致度スコアを利用する組成推定

スペクトルからの組成計算の機能(Molecular Formula Generation, MFG)は

- ・ 主ピークの質量一致度
 - ・ 同位体ピークの質量一致度
 - ・ 同位体ピークのアバンダンス比の一致度
- の3つのスコアから計算されます。

MSスペクトルを囲う「四角い枠」は
理論値のマスペクトル



同位体ピークマッチスコア

m/z		Ion	Formula	Abundance	総合スコア							
233.1283		(M+H)+	C13H17N2O2	84149.5								
Best		Formula (M)	Ion Formula	Score	Cross Score	Calc m/z	Diff (ppm)	Mass Match	Abund Match	Spacing Match		
☒		C13H16N2O2	C13H17N2O2	99.74		233.1285	0.55	99.85	99.64	99.64		
Isotope		Abund Sum%	Calc Abund Sum%	m/z	Calc m/z	Diff (ppm)						
1		85.98	85.74	233.1283	233.1285	0.55						
2		12.5	12.91	234.1316	234.1315	-0.33						
3		1.26	1.26	235.1348	235.1341	-2.88						
4		0.27	0.09	236.1422	236.1366	-23.89						
Best		Formula (M)	Ion Formula	Score	Cross Score	Calc m/z	Diff (ppm)	Mass Match	Abund Match	Spacing Match		
☐		C6H16N8S	C6H17N8S	81.67		233.1291	3.48	94.19	68.05	72.99		
☐		C9H12N8	C9H13N8	74.69		233.1258	-11.03	54.88	96.67	87.95		
☐		C9H12N8S	C9H13N8S	65.33		233.1266	-2.11	55.24	88.22	85.34		

6) Molecular Structure Correlator(MSC)

化合物構造推定支援ソフト

MSCソフトは強力なアルゴリズムで様々な化合物の構造推定を迅速に行う支援ソフトです。プリカーサー（前駆イオン）の精密質量情報からの組成情報を利用し、かつプロダクトイオンの精密質量情報から予想されるプロダクトイオンの構造推定をおこない、化学物質の構造予想を支援するソフトです。

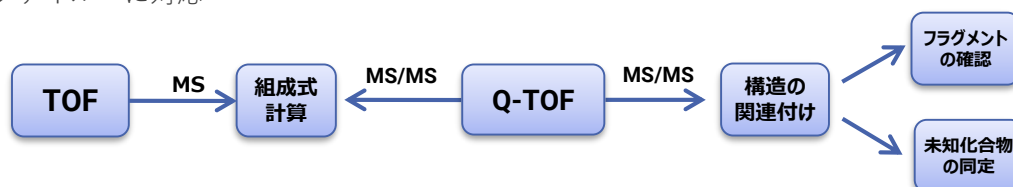
The screenshot displays the CompoundA software interface with several key panels highlighted by yellow boxes:

- プリカーサーイオンの組成式候補** (Precursor Ion Composition Candidates): A table listing potential precursor ions with columns for ID, Formula, m/z, and Pro.
- プリカーサーイオンの構造式候補** (Precursor Ion Structure Candidates): A panel showing chemical structures and their corresponding Standard InChI keys and Compatibility Scores.
- プロダクトイオンの組成式候補** (Product Ion Composition Candidates): A table listing potential product ions with columns for m/z, intensity, Product, and dM.
- プロダクトイオンの精密質量** (Product Ion Precise Mass): A table showing the mass, intensity, candidate, and best score for product ions.
- プロダクトイオンの構造式** (Product Ion Structure): A panel showing chemical structures and their corresponding Standard InChI keys and Compatibility Scores.

◆ ノンターゲットでの化合物同定に有効な機能

MS/MSデータから構造式を推定します。
プリカーサー（前駆イオン）の精密質量情報からの組成情報を利用し、かつプロダクトイオンの精密質量情報から予想されるプロダクトイオンの構造推定をおこない、化学物質の構造予想を支援するソフトです
LC-QTOFとGC-QTOFに対応

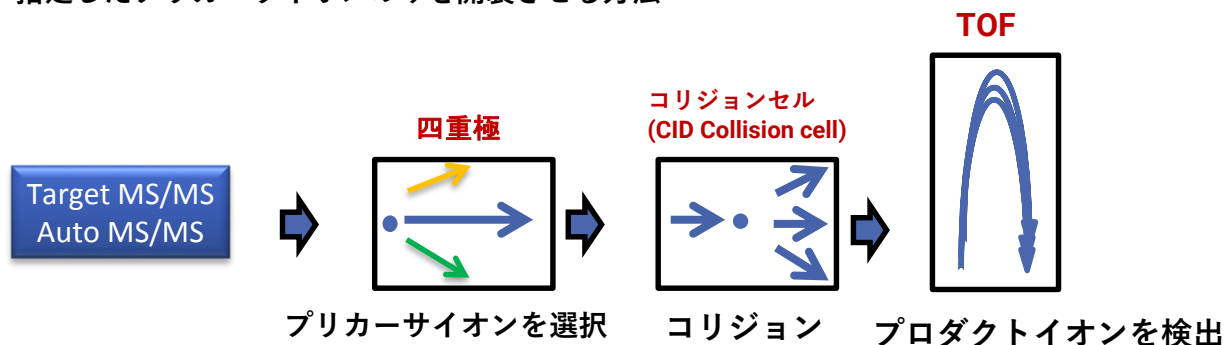
ChemSpider収載の全化合物、
Agilent化合物データベース(PCDL)（ユーザーでカスタマイズ可能）
molファイル に対応



7) All Ions MS/MS法

◆ Target MS/MS, Auto MS/MS -プロダクトイオンスキャン

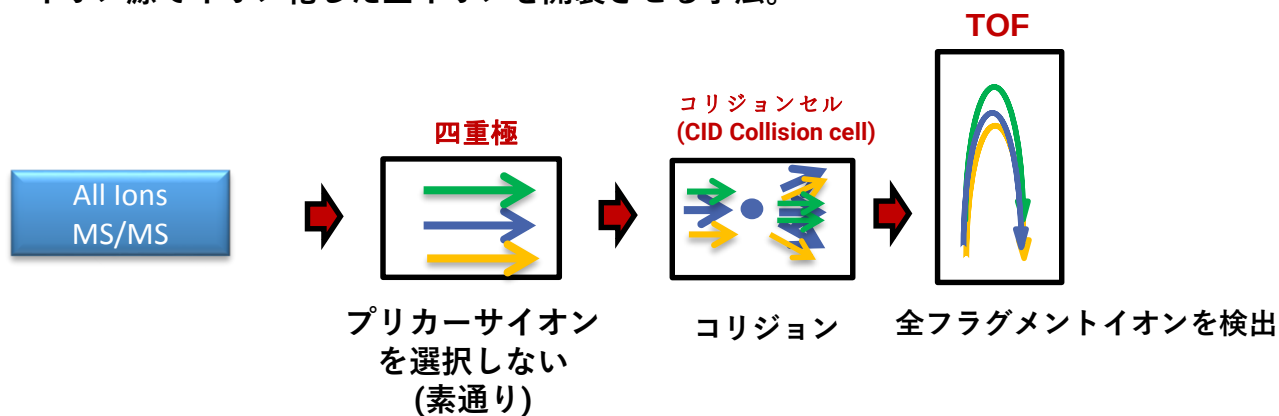
指定したプリカーサイオンのみを開裂させる方法



- 対象化合物を認識しておく必要がある。
- プリカーサイオンを指定するのでマトリックスの影響を受けにくい

◆ All Ions MS/MS法 -偽陽性を低減する新しい手法

イオン源でイオン化した全イオンを開裂させる手法。



- 1回の測定で網羅的 MSMS が可能
- 対象成分数に制限がない
- プリカーサイオンを指定していないのでマトリックスイオンの影響がある
- 既存 MS/MS スペクトル情報を利用し、プロダクトイオンを検知
- 該当するイオンのクロマトピーク形状を診断

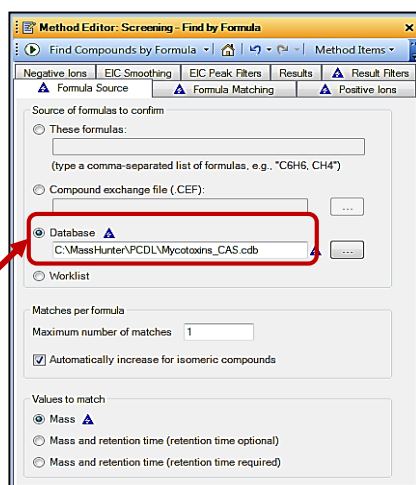
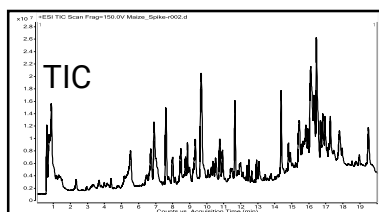
8) Find by Formula (FbF)

化合物の有無をスクリーニングする

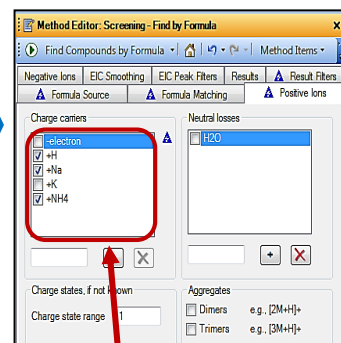
MassHunter定性解析ソフトウェアの機能で、存在の有無を確認したい化合物を生データに対してスクリーニングできます。

質量精度と同位体ピークパターンが一致するものが存在する場合は、そのスコアと共に表示されます。

- ◆ データベース中の組成式情報とイオン種の設定に基づき、全自動で化合物スクリーニングを行う

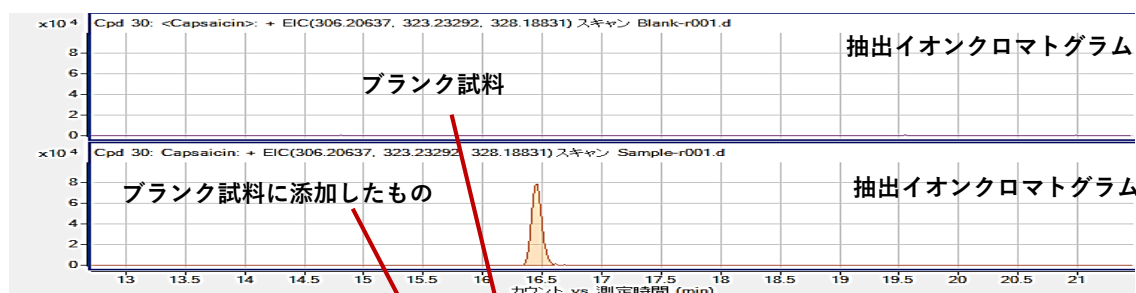


データベースの選択
RT情報利用の選択



イオン種の設定

◆ FbFによるスクリーニング結果の例



ファイル	名前	Flags (FbF)	式	スコア	差 (DB, ppm)
Blank-r001.d	<Capsaicin>	no EIC peaks	C18 H27 N O3		
Sample-r001.d	Capsaicin		C18 H27 N O3	99.00	0.26

検出の判定が色表示されます



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマーコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

アジレントの製品は、研究目的のみ使用できます。

診断目的では使用できません。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様書は
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. 2017



Agilent Technologies