

Instrument: GC-TOFMS and ChromaTOF® Sync Software

EMPOWERING RESULTS
Elemental Analysis | GC Mass Spectrometry | Metallography

市販コーラ飲料ヘッドスペース中の 包装由来汚染物質

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: Cola, GC-TOFMS, Mass Spectrometry, Deconvolution, Pooled Evaporative HS-SPME, ChromaTOF Sync 1D



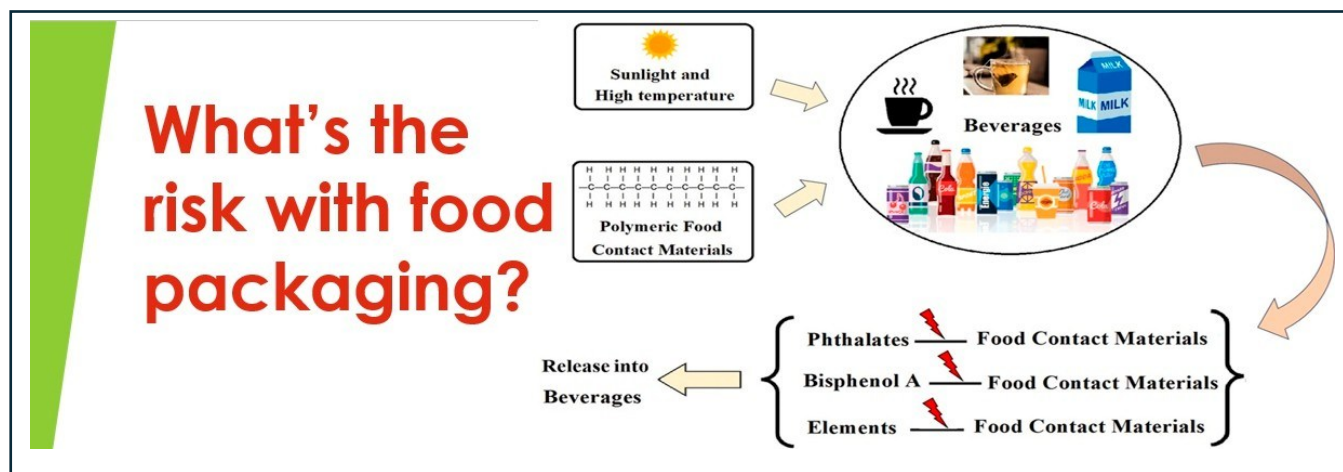
Introduction

食品包装は、食品製造者と消費者をつなぐ搬送材料として機能するため、食品産業において不可欠な構成要素です。輸送、保管、および取扱いの過程で、包装材料は、人体に害を及ぼす可能性のある物質、病原体、汚染物質への接触や、食品の早期劣化から食品を保護します。^{1,2}

食品包装には、プラスチック、ガラス、金属、紙、およびそれらの複合材料など、さまざまな材料が用いられています。これらの製品には可塑剤、モノマー、オリゴマーなどの添加剤も含まれており、これらの化学物質は加工または包装時の接触により食品へ汚染物質を移行させる可能性があります。この相互作用により、食品の品質および安全性が変化する場合があります。また、食品香気成分の収着（スカルピング）と、包装材料から食品への望ましくない成分の移行（リーチング）の双方により、風味が変化することもあります。したがって、可食製品中の食品包装由来残留物をスクリーニングできることが重要です。^{1,2}

EU framework No. 1935/2004 および EU 2020/1245 に見られるように、法規制では最終製品中に存在する汚染物質について製造者が責任を負うことが求められています。これらの試料は複雑であり、潜在的なリスクを迅速に同定する必要があるため、ガスクロマトグラフィー（GC）や飛行時間型質量分析（TOFMS）など、さまざまな分析アプローチが長年にわたり開発されてきました。これらはノンターゲットスクリーニングに有用な優れた手法です。複数試料に対するこのようなデータのノンターゲットレビューおよび比較を効率化するソフトウェアツールは、この分析技術の有用性をさらに高めます。そこで本研究では、データ処理を簡便化し、答えを追求する分析者を強力に支援できるデータアライメントツールである ChromaTOF Sync を使用しました。

当初のプロジェクトは、さまざまなコーラ中の香味成分の傾向を明らかにすることを目的としていましたが、データ解析の過程で予期しない包装由来汚染物質の存在が明らかになりました。これは、GC-TOFMS がノンターゲット分析において有する能力を示しています。本アプリケーションノートでは、市販の Cola 飲料中に存在する一部の包装由来汚染物質に対する有効なノンターゲットスクリーニングを示します。また、分析した飲料中に存在する個々の包装由来汚染物質の傾向を容易に確認するための ChromaTOF Sync の活用についても示します。



実験条件

8 ブランドが製造する市販の各種 Cola 飲料を Pegasus® BT で分析しました。試料前処理手順および装置条件を Table 1 に示します。

Table 1 : Pegasus BT の試料導入条件および装置条件

Sample Introduction	HS-SPME
Sample Volume	20 μ L in a 10 mL vial
SPME Fiber	Triple-bed Supelco SPME fiber (DVB/CAR/PDMS)
Incubation	1 min @ 60 °C
Extraction	10 min @ 60 °C
Desorption	3 min @ 250 °C
GC (in 1D mode)	Agilent 7890
Injection	3 min fiber desorption with inlet temp 250 °C, Split 10:1
Columns	1D: Rxi-SVOC, 20 m x 0.18 mm x 0.18 μ m (Restek) 2D: Rxi-17Sil MS, 1 m x 0.18 mm x 0.18 μ m (Restek)
Carrier Gas	Helium @ 1.01 mL/min
Oven Program	50 °C (0.3 min), ramp @ 15.6 °C/min to 280 °C (3.2 min)
Secondary Oven offset	+ 5 °C (relative to primary oven temperature)
Modulator offset	+ 15 °C (relative to secondary oven temperature)
Transfer line	300 °C
MS	LECO Pegasus BT TOFMS
Ion Source Temperature	250 °C
Mass Range	35-400 m/z
1D Acquisition Rate	10 Spectra/s

結果および考察

13 種類すべての cola 試料について、代表的な GC-TOFMS クロマトグラムを Figure 1 に示します。これらは多数の分析対象ピークを含む複雑な試料です。初めに、試料ファイルを ChromaTOF のピーク検出機能を用いて S/N 比 10 でデータ処理したところ、各試料あたり約 400 ピークが検出されました。これにより詳細な情報が得られ、各試料について包括的なノンターゲットレビューが可能となりました。しかし、個別のピークテーブルから得られる多くのピーク情報を関連付け、試料群全体にわたる分析対象成分の傾向を観察することは容易ではありません。例えば、13 試料全体では、分析者は約 5200 ピークを確認する必要があり、長時間を要する作業となります。この試料比較を効率化するため、cola 飲料については ChromaTOF Sync でも処理を行い、ピーク検出とデータアライメントにより、全試料を通じて約 600 ピークをまとめた統合ピークテーブルを作成しました。その結果、多くの予想される香気化合物に加えて、食品包装に関連するいくつかのノンターゲット分析対象成分が観察されました。

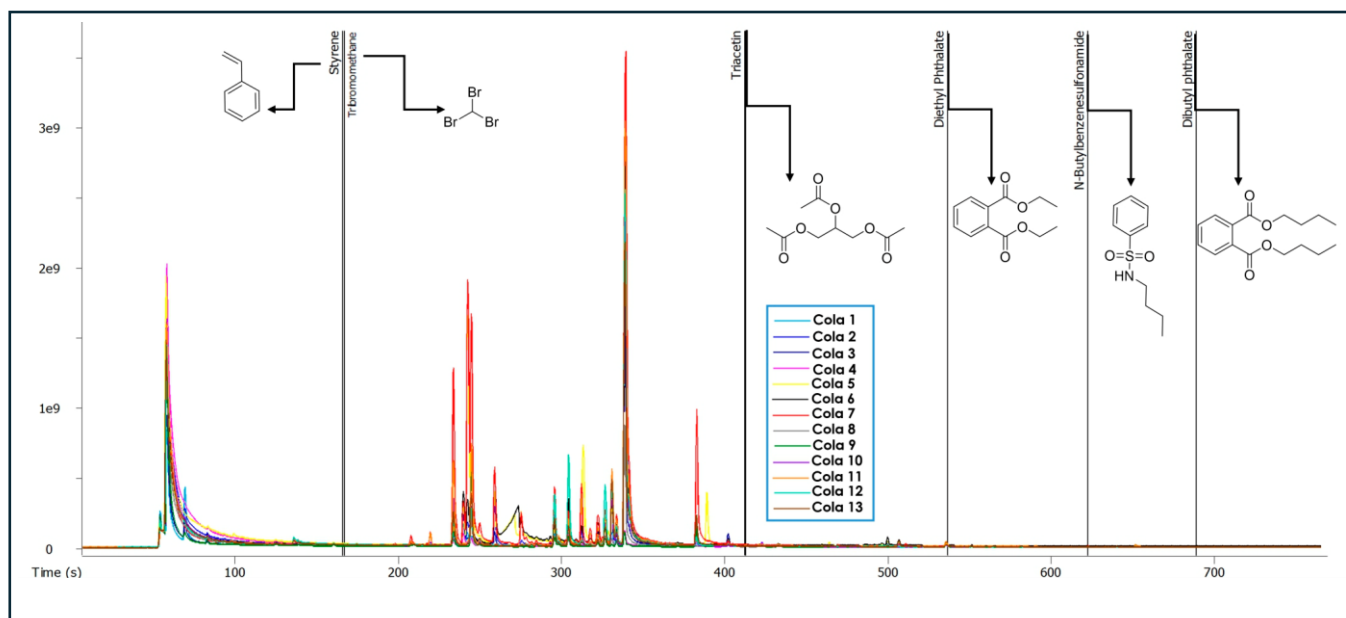


Figure 1. 13 種類のコーラ飲料試料の重ね合わせ全イオンクロマトグラム (TIC) 中に確認された包装由来汚染物質。

これらの包装由来汚染物質の一部を示すアライメント済みテーブルの抜粋を Table 2 に示します。これらはメソッドブランクと比較して、cola 試料中で高いレベルで観察されました。*ChromaTOF Sync* は全試料のピーク面積を集約し、試料群における傾向を視覚化しやすくするヒートマップ機能を備えています。Table 2 から、同一メーカーの無糖製品である Cola 試料 5 および 6 において、2-ethylhexanoic acid および 3,5,5-trimethylhexanoic acid が高レベルで存在することが容易に確認できます。

Table 2 : 同定された包装由来汚染物質に対する *ChromaTOF Sync* のヒートマップ機能

Name	Formula	Similarity	CAS	R.I	R.I. (Lib)	Description	RT (s)	Cola 1	Cola 2	Cola 3	Cola 4	Cola 5	Cola 6	Cola 7	Cola 8	Cola 9	Cola 10	Cola 11	Cola 12	Cola 13
Triacetin	C ₉ H ₁₈ O ₆	935	102-76-1	1339	1350	Plasticizer	412.7													
NBBS	C ₁₀ H ₁₈ NO ₂ S	932	3622-84-2	1792	1796	Plasticizer	622.6													
3,5,5-Trimethylhexanoic acid	C ₉ H ₁₈ O ₂	904	3302-10-1	1131	N.A.	Plasticizer	298.8													
Tribromomethane	CHBr ₃	885	75-25-2	899	892	Lubricant	166.9													
Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	881	84-74-2	1960	1965	Plasticizer	688.7													
2-Ethylhexanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	860	149-57-5	1115	1123	Plasticizer	289.7													
Styrene	C ₈ H ₈	821	100-42-5	897	893	Polystyrene	165.5													
Diethyl Phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	805	84-66-2	1593	1594	Plasticizer	536.8													

ChromaTOF Sync は、多数の試料間で生じる可能性のある保持時間のずれにも対応できます。例えば Figure 2 では、*ChromaTOF Sync* により、Cola 6 飲料中で 1.2 秒シフトした 2-エチルヘキサン酸が自動的に同定されています。

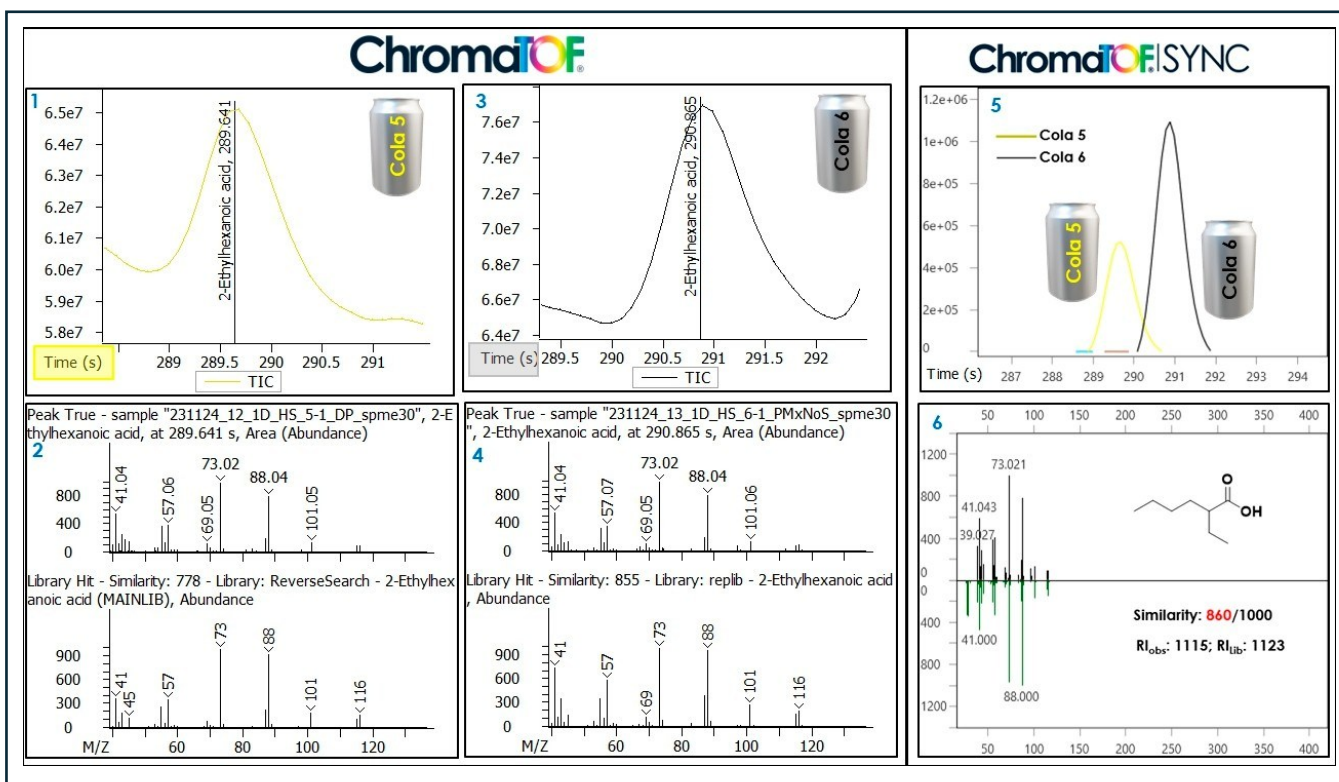


Figure 2. (1) Cola 5 中の 2-エチルヘキサン酸の TIC ; (2) Cola 5 中の 2-エチルヘキサン酸の質量スペクトル ; (3) Cola 6 中の 2-エチルヘキサン酸の TIC ; (4) Cola 6 中の 2-エチルヘキサン酸の質量スペクトル ; (5) Cola 5 および Cola 6 中の 2-エチルヘキサン酸の重ね合わせ TIC ; (6) 2-エチルヘキサン酸の観測質量スペクトル (黒) と NIST ライブラリデータベース (緑) との照合。

個々の分析対象成分についても、試験した試料中に傾向が認められるかどうかを確認できます。フタル酸エステル類は、プラスチックの柔軟性および耐久性を確保するために使用されることから、食品包装由来の汚染物質として想定されます。しかし、高濃度では内分泌かく乱物質として作用し、健康問題を引き起こす可能性もあるため、このような汚染物質を継続的に把握することが重要です。Figure 3 に示すように、フタル酸ジエチルおよびフタル酸ジブチルはすべてのコーラ飲料で暫定的に同定され、スペクトルマッチング (類似度スコア 805 および 881) ならびに RI 確認 (観測 RI はそれぞれ 1593 および 1960、ライブラリ RI はそれぞれ 1594 および 1965) の両方により確認されました。フタル酸ジエチルおよびフタル酸ジブチルは、Cola 2、Cola 6、および Cola 11 で高いレベルで存在することが確認されました (Figure 3、セクション 3 および 6)。

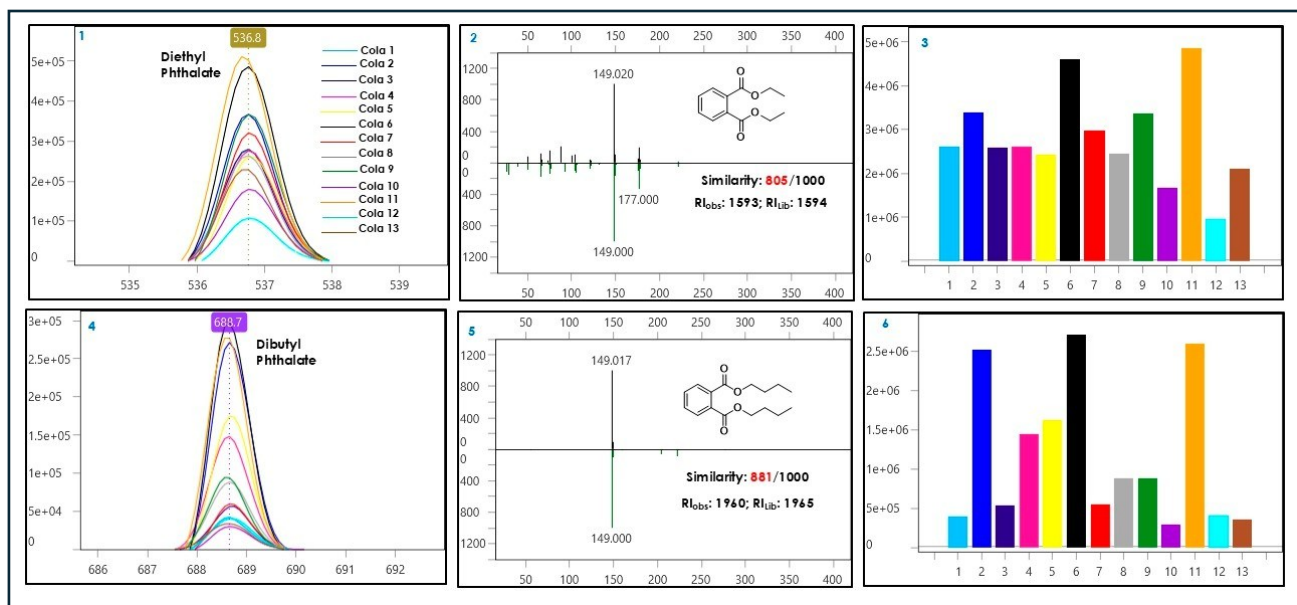


Figure 3. (1) フタル酸ジエチルの重ね合わせ TIC；(2) フタル酸ジエチルの観測質量スペクトル（黒）と NIST ライブラリデータベース（緑）との照合；(3) フタル酸ジエチルの棒グラフ表示；(4) フタル酸ジブチルの重ね合わせ TIC；(5) フタル酸ジブチルの観測質量スペクトル（黒）と NIST ライブラリデータベース（緑）との照合；(6) フタル酸ジブチルの棒グラフ表示。

スチレンも一般的な包装由来汚染物質の一つであり、高濃度では発がん性を有します。欧州食品安全機関は食品中スチレンの最大許容限度を 0.6 mg/kg としている一方、世界保健機関（WHO）および世界食糧機関は耐容一日摂取量を 40 mg/kg 体重/日としています。^{2,3,4} Figure 4 に示すように、Cola 7 において高レベルのスチレンが暫定的に同定され、スペクトルマッチング（類似度スコア 821）および観測 RI897（ライブラリ RI893）により確認されました。この初期ノンターゲットスクリーニングにより、このような分析対象成分を明らかにすることができ、今後の研究ではこれらを定量対象として設定し、既知の曝露閾値と比較することが可能となります。

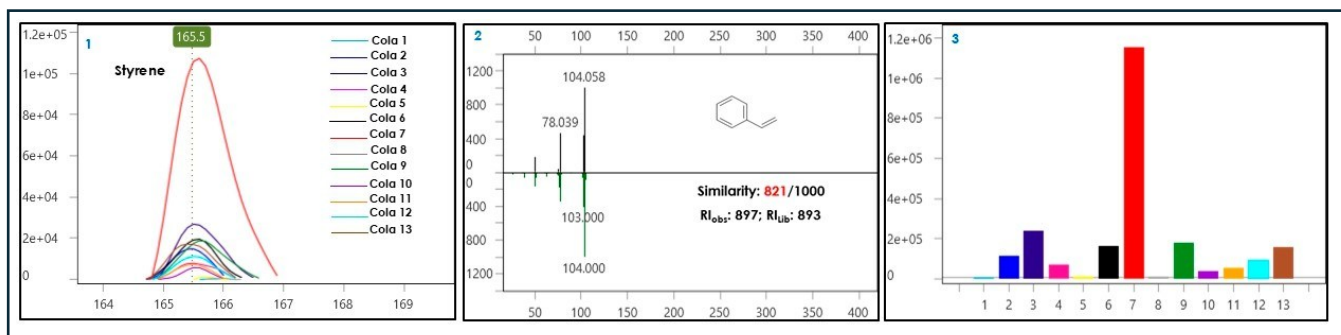


Figure 4. 他の 12 種類のコーラ試料と比較して、Cola 7 で高レベルに検出されたスチレン。(1) スチレンの重ね合わせ全イオンクロマトグラム (TIC)；(2) スチレンの観測スペクトル（黒）と NIST ライブラリデータベース（緑）との照合；(3) 分析した 13 種類の飲料試料中に検出されたスチレン濃度の棒グラフ。

PCA スコアプロット (Figure 5) では、13 種類のコーラ飲料が主成分軸の反対象限に分かれてプロットされていることが示されています。興味深いことに、これらの結果は、二つの有名なコーラメーカー間における長年の「コーラ戦争」という疑問に一つの答えを与えるものです。すなわち、これらの予備的結果から、Cola 3 および Cola 4 はいずれもオリジナル飲料であり、異なる企業によって製造されているにもかかわらず、化学プロファイルが非常に類似していることが示唆されます。もう一つの興味深い観察結果として、無糖飲料では化学プロファイルの差異がより大きく、これは Cola 1 および 2 と、Cola 5 および 6 を比較することで確認できます。

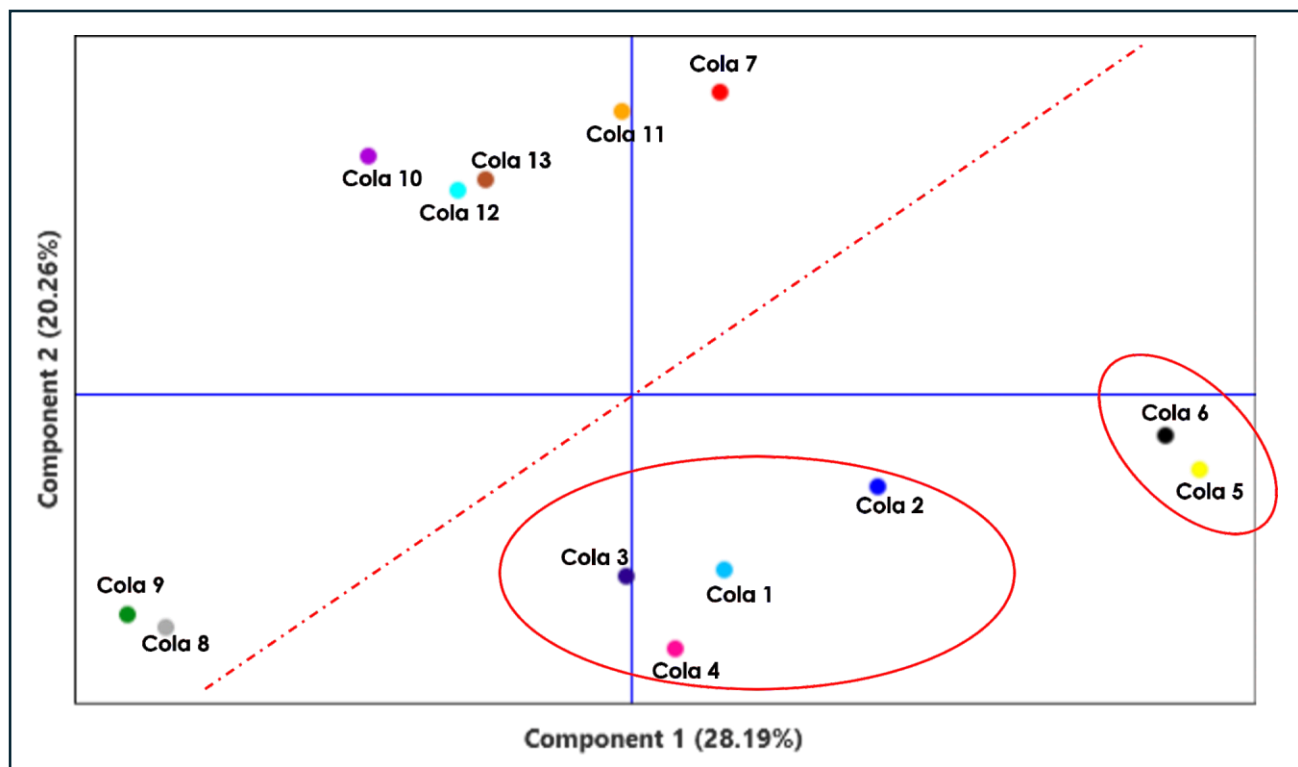


Figure 5. 統合ピーク情報から作成したPCAスコアプロットにより、コーラ飲料がPC1上で識別されることが示された。

結論

GC-TOFMS を用いることで、13 種類のコーラ飲料のヘッドスペース中に存在する微量汚染物質を正確に分離し、検出することができました。当初のプロジェクトは、各種コーラ中の香味成分を探索することを目的としていましたが、*ChromaTOF Sync* により予期しない包装由来汚染物質の存在も明らかとなり、ノンターゲットサーベイランスにおける本システムの有用性が示されました。このデータアライメントソフトウェアを使用することで、複数試料を一つのピークテーブルに統合してレビューし、手作業によるクロマトグラム比較では検出が困難な微小な差異や特徴を抽出することが可能でした。*ChromaTOF Sync* における PCA などの高度なデータ比較も、データおよび試料中の傾向を明らかにする上で有用でした。本研究の結果は、すべてのコーラが同一ではなく、既知の食品包装由来汚染物質の相対存在量が、製造者、包装材料、および摂取されるコーラの種類によって異なることを示唆しています。これらのレベルが懸念されるものであるかどうかを明らかにし、EU framework No. 1935/2004 および EU 2020/1245 に適合するためには、さらなる定量研究が必要です。

謝辞

本アプリケーションノートは、The Open University (英国ミルトン・キーンズ) Faculty of STEM, School of Physical Sciences の Simona Nicoara および Geraint Morgan (geraint.morgan@open.ac.uk) との共同研究により作成された。

参考文献

¹Graño, S.G., Sendón, R., Hernández, J.L., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., *Polymers*, 2018, 10, 802, DOI: 10.3390/polym10070802.

²Sadighara, P., Akbari, N., Mostashari, P., Yazdanfar, N., Shokri, S., *Food Chemistry*, 2022, 100238, 1-4, DOI: 10.1016/j.fochx.2022.100238.

³Chiesa, L. M., Soncin, S., Panseri, S., Cantoni, C., *Veterinary Research Communication*, 2008, 32, S319–S321, DOI: 10.1007/s11259-008-9138-7.

⁴Holmes, M. J., Hart, A., Northing, P., Oldring, P. K. T., Castle, L., Stott, D., Smith, G., Wardman, O., *Food Additives & Contaminants*, 2022, 22 (10), 907-919, DOI: 10.1080/02652030500307172.

LECO Corporation | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | 269-985-5496

info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2015 Certified | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.

Pegasus, ChromaTOF, Quadlet are trademarks of LECO Corporation.