

Technical Report

固相抽出 (SPE) と GC×GC-MS を用いた MOSH および MOAH の分析

Analysis of MOSH and MOAH using SPE Prior to GC×GC-MS Analysis

Luigi Mondello¹

Abstract:

食品中に混入したミネラルオイルの同定と定量のため、FIDとMSのデュアル検出を用いた包括的2次元ガスクロマトグラフィー法の開発と最適化を行った。分析に先立ち、主要混入物である飽和炭化水素と芳香族炭化水素を、銀シリカ固相抽出 (SPE) カートリッジで分画した。検出された一連の未知化合物は質量スペクトルデータから、植物油ベースのインク由来のエステル化脂肪酸と推測できた。

Keywords: 食品、MOSH、MOAH、GC×GC、包括的2D GC、Quadrupole mass spectrometer

1. はじめに

ミネラルオイル製品は、原油から蒸留過程やさまざまな精製段階を経て作られ、ミネラルオイル飽和炭化水素類 (MOSH; 例えば n-アルカン、イソアルカン、シクロアルカン) やミネラルオイル芳香族炭化水素類 (MOAH; 主にアルキル化多環芳香族炭化水素 (PAH)) が、ある割合で含まれている^[1]。

さまざまな汚染源による食品へのミネラルオイル混入は、かなり前から研究されている^[2-4]。1997年頃から、主要な汚染源のひとつとしてボール紙包装が知られていたが^[2]、最近、特に注目され始めている^[5,6]。このような汚染物は、梱包材に使用されている印刷インクやリサイクル材に使用されている新聞紙のインクに由来している。ボール紙から移動してくるミネラルオイルには、普通、多くの (15~20%) のMOAHを含んでおり^[3,4]、毒性学の観点から一層懸念されている。

食品中へのミネラルオイルの混入とその危険性については、近年、広く議論されている^[7-10]。FAO/WHO合同食品添加物専門家会議 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA) は、2002年、さまざまなホワイトミネラルオイルの1日摂取許容量 (ADI) 値のリストを報告した。これによると、ボール紙梱包から乾燥食品へのMOSH (C25まで) 移動の想定限度として、0.6 mg/kgが提唱されている^[7]。欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) は、2012年6月、毒物情報が不十分であるという理由で“JECFA”のリストには疑義があるという見解を表明^[9]、その結果、JECFAの値は最近取り下げられた^[10]。さらに、EFSAはMOAH成分の発癌リスクの可能性を強調しながらも、正式に承認されたMOAHの評価はまだない。

ここ20年ぐらいの報告は、汚染源指標としてオフラインやオンライン技術によるMOSH分析を用いるものが多かった。オフライン法ではプレップLCや固相抽出 (SPE) をベースにしたものが報告されている^[11-18]。脂質分画の除去は、けん化処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う方法^[11,12]、直接プレップLCカラムを通す

方法^[13,14]、またはSPEカートリッジを通す方法^[15-18]が可能である。また、ガラスSPEを使用する方法も報告されている。その充填剤に関しては、活性シリカゲル^[16]、不活性シリカゲル^[17]、銀 (Ag) シリカゲル^[18]などさまざまな提案がされている。

あらゆる手法の中で最もよく使われているテクニックは、シリカLCカラムを用いたオンライン液体クロマトグラフ - ガスクロマトグラフ (LC-GC) であることは明らかである^[6,19-23]。また、MOAHのもつ毒性の観点から、MOSHをMOAHからあらかじめきれいに分離させる研究がされている。たとえば、Biedermannとその共同研究者は、MOSHや脂質マトリクスからMOAHを分離させるため、オンラインLC-GCシステムで、LCシリカカラムの分離効率の良さを利用した^[20]。また、MOSHとMOAH決定のために、AgシリカゲルSPEカートリッジを用いたオフラインSPE法も開発された^[24,25]。

検出器としては、水素炎イオン化検出器 (FID) システムがMOSH /MOAHの分析で広く使われており、unresolved complex mixtures (UCM) のこぶを利用することで信頼性のある定量が可能である。FIDは構造情報が得られないという欠点があるのは確かだが、基本的に炭化水素の質量あたり同じ応答が得られる点で有用である^[23]。実際にMOSHとMOAHの成分構成について詳しく分かれば、潜在毒性やその汚染源についての基本的な情報を得ることができる。この目的を達成したのがBiedermannとGrobで、彼らはMS検出器を用い、包括的2D GC (GC×GC) 分析で得られる情報をあわせて利用した^[26]。MOSHとMOAHの予備分離はオフラインLCで行ったが、この過程により (2環および3環の) アルキル化芳香族を伴う (MOSH留分にある) ホパンとステランの重なりを除くことができた。GC×GCシステムは、定性のためのMSシステムと定量のためのFIDシステムに交互につながられた。つまり、2つのアプリケーションシステムを用いることで、定性と定量の両情報を得ることができた。オフラインLCによる予備分離後、GC×GC-MS分析を行う方法は、Mondelloとその共同研究者によっても使用され、

均質化された離乳食中のMOSH汚染についてより広範な知見が得られた^[27]。

ここでは、デュアルMS/FID検出を用いたGC×GC法による、さまざまな食品中のMOSHやMOAHの定性および定量分析について報告する。予備分離はAg-SPEを用いた。

2. 実験方法

2-1. 試料と薬品

CH₂Cl₂とn-ヘキサンはSigma-Aldrich (Milan, Italy) から購入し、使用前に蒸留した。C7-C40 標準混合サンプル、パラフィンオイル (code 18512)、AgNO₃およびシリカゲル60 (粒径0.063-0.2 mm, 70-230 mesh) はSupelcoとSigma-Aldrich (Milan) から入手した。ガラスSPEカートリッジ (フリット付き, 6 mLガラス管) はMacherey-Nagel (Chromabond, Düren, Germany) から入手した。

2-2. 試料と前処理

パスタ、米、粉砂糖の試料はスーパーマーケットで購入した。粉碎試料はn-ヘキサンで一晩抽出し、その後、Ag-SPEで精製した。要約すると、溶媒に対し比率1:2の食品を用いて、試料からMOSHとMOAHを抽出した。抽出物の一部は、SPEクリーンアップ前に、銀シリカゲルカートリッジで濃縮した。あらかじめ活性化させておいた銀シリカゲル (400°C 一晩) に、硝酸銀溶液 (0.75 g/mL in Milli-Q water, Millipore, Bedford, MA, USA) を加え、約30分攪拌、12時間静置した。最後に、混合物を75°Cで一晩加熱し、残留水分を除去した。SPE ガラスカートリッジは、約1 gの銀シリカを手で充填し、試料 (250 μL) をロードした。試料をまず1 mL n-ヘキサンで溶離し、溶出させた。次に、MOSHグループを1.5 mL n-ヘキサン、それに続く0.5 mL n-hexane/dichloromethaneで溶離させ (50:50 v/v)、0.5 mL n-hexane/dichloromethane 分画に溶出させた。MOAHクラスは、7 mL n-hexane/dichloromethane (50:50 v/v) でさらに溶離させた。大量注入 (LVI) は行わず、溶出分画は最終体積100 μLまで濃縮し、感度を高めた。

2-3. GC×GC-MS/FID分析

GC×GC 実験は、ガスクロマトグラフGC-2010 Plusと四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010 Ultraからなるシステムを用いて行った。

第1カラムとして、SLB-5ms 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm df [silphenylene polymer, 極性的にはpoly (5% diphenyl/95% methyl siloxane) と同等] を空カラム (1.0 m × 0.25 mm ID, ダブルループ形成のために使用) に接続、さらに、Supelcowax-10 1.0 m × 0.10 mm ID × 0.10 μm df (polyethylene glycol) に接続した (Supelco)。第2カラムは、キャピラリーカラムスプリッタ (SGE) を用いて2つの空カラムに接続、一方はFIDへ (0.5 m × 0.1 mm ID)、もう一方はMSにつないだ (0.25 m × 0.05 mm ID)。

2-4. 分析条件

モジュレーションは、ルーブタイプモジュレータ (Zoex Corporation, Houston, TX, USA) を使用し、モジュレーション時間は6000 msecで行った。ホットパルス (350°C) の幅は375 msecであった。

GCオープン温度プログラムは、昇温速度4°C/minで50°C から280°C (7.5 min保持) で行った。キャリアガス、Heは初期圧力243 kPa (一定線型速度モード)、注入温度360°C、注入モードと体積はスプリット (スプリット比1:10)、高圧注入 (300 kPaで1分間)、6 μLで行った。FIDは以下の条件で動作させた。

H₂ 流量:40.0 mL/min、空気流量:400.0 mL/min、メイクアップ (He) :30.0 mL/min

MSのパラメータは以下の通りである。試料はスキャン速度:20,000 amu/sec、質量範囲:40~510 m/z、サンプリング速度:33Hz、インターフェース温度:250°C、イオン源温度:200°C、イオン化モードEIで分析した。

3. 結果と考察

3-1. GC×GC-MS/FIDの最適化と検証

GC×GC法の最適化はオフセット印刷のインクを用いて行った。このインクの主成分はMOSH (> 90%) で、少量のMOAH画分が含まれている。共溶出に関する問題は別にして、オフセットインクをそのまま注入すると、MOSH成分がカラムとモジュレータでオーバーロードしてしまい、MOAH成分はほとんど検出できないと考えられる。従って、Ag-SPEカートリッジでの予備分離が必要であった。

2つの要求を満足させるため、FIDとMSユニットにフローを分岐させた。その要求の1つは良好な感度で定量を行うことである。2つの検出器は異なった圧力条件で使用されるため、同じ内径を持つ2つの分岐系を採用するのは良くない。“MS”への流路に適切な抵抗をもたせ、流量をFID側に多く流そうとすると、“MS”側の流路長を非常に長くする必要がある。しかし、このような構成では、定性と定量のための2つの系の第2次元目の溶出時間に大きな差が生じてしまうと考えられる。最終的に、MS側へは0.25 m × 0.05 mm ID、FID側へは0.5 m × 0.1 mm ID の分岐系を使用するのが比較的良好ことがわかった。

このような分岐条件を用いると、初期分析温度時において、流量の84%がFIDへ、16%がMSへ流れた。この分岐比は分析中で変化するが、その変化量は大きくなく、分析終了時点での分岐比はFID方向へは87%、MS方向へは13%であった。検量線データは同じ分析条件下で行ったので、定量結果への影響はなかった。

GC×GCのデュアル検出の分析条件は、MS単体の系と同じクロマト性能が得られるよう最適化した。その結果をFig. 1に示す。MS単体のアプローチでは同じ分析カラムを用い、第1次元と第2次元がそれぞれ約20 cm/secと210 cm/secになるようにヘッド圧を約150 kPaにした。デュアル検出系では圧力243 kPaにすると第1次元目のガス速度を同じ (同じ溶出温度) にでき、第2次元目のガス速度はやや減少した (180 cm/sec)。

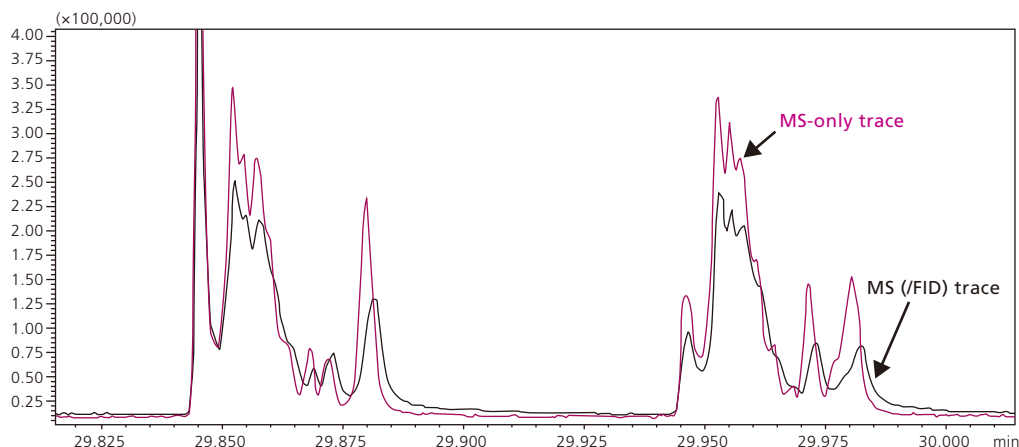


Fig. 1 GC×GC-MSとGC×GC-MS/FIDシステムを用いて得られた拡大生TICクロマトグラムの比較(印刷インク分析)

6点検量線(各点2回測定)を、パラフィンオイルを0.35-24 mg/kgの範囲で、n-ヘキサン溶媒に溶かしたFIDトレースで作成した。最小二乗法を用いて回帰曲線を作成、その曲線の線形性と良好さの評価は回帰係数(0.9993)と回帰曲線図を目視確認、また、Mandel検定法で行った($F_{calc} < F_{tab}$)。切片の優位性($p=0.03$)は、t検定で5%の優位性レベルであった。

ミネラルオイルの定量下限値(LoQ)の測定は汚染物の分子量の分布、つまり、こぶの幅と密接に関係している。しかし、近似的にLoQは最小検量点での標準偏差($n=3$)と考えた。LoQは、およそ1.2 mg/kgと見積れた。

3-2. 食品分析

パスタ、粉砂糖、米のMOSH画分とMOAH画分の量を、前述の方法を用いて(要求想定上限値である)C25まで定量した。この際、MOSH化合物から天然のアルカンを、またMOAHグループからは“未知”のピークを除いて積分するよう注意した。GC×GC-FIDに対しては、“多角形積分機能”を利用した。この機能を用いると多角形領域を定義でき、その領域のすべての積分ピークを自動で合算し、それぞれの値も保存できる。従って、不要なピークを簡単に選び出し、全体の面積から差し引くことができる。3種類の食品の定量情報をTable 1に示す。

Table 1 Ag-SPE-GC×GC-MS/FIDを用いて得られたパスタ、粉砂糖および米試料中のMOSHとMOAH成分の定量値

食品	MOSH < C25 (mg/kg)	MOAH < C25 (mg/kg)
パスタ	3.5	1.6
粉砂糖	8.4	1.3
米	33.8	2.2

3-3. MOAH画分のGC×GC-MS結果

3種類の試料のGC×GCクロマトグラムに現れるピークについて、MSデータベースの類似度($\geq 80\%$)とそのデータベースに登録されている線型保持指標(LRI)を用いて同定した。GC×GCに対しLRI値の計算は広く受け入れられている手法ではないので、ここでは1次元のモードで計算した。つまり、極性カラムの保持時間の影響を考慮し、やや広めに設定したLRIのウィンドウ(± 25 units)を用いて、ヒットした化合物をフィルタリングした。同定された化合物を測定で得られたLRIとデータベースLRIとともにTable 2に示す。

LRIの範囲外にあった化合物が2つあった。つまり、octyldecanoateとoctyltetradecanoateのLRIの差は、それぞれ+56と

+57であった。これらの化合物のデータベースのLRI値(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)は、メチルシリコン系のキャピラリカラム[(Ultra-1) 25 m × 0.32 mm × 0.25 μm]を用いて得られたものであるが、本研究ではsilphenylene polymerの液層の30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μmカラムを使用している。類似度の一致は良好で、2Dクロマトグラムの化合物の位置から化学構造についての情報が得られ、これらの溶質成分に化合物名を与えることができた。

Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4にそれぞれパスタ、米、粉砂糖試料のGC×GC-MSクロマトグラムを示す。

Table 2 “MOAH” GC×GC-MS分析で同定された化合物とそれぞれのデータベース記載のLRI (データベースのLRI)と実験で得られたLRI (LRI)、およびスペクトルの一致度 (MS%)

化合物	パスタ MS%	粉砂糖 MS%	米 MS%	LRI	データベースの LRI
1 Isopropyl dodecanoate	94	93	95	1622	1627
2 Dioctylether	92	93	94	1667	1688
3 2-Ethylhexyl octanoate	87	85	87	1703	1715
4 Ethyltetradecanoate	-	-	82	1798	1795
5 Isopropyltetradecanoate	93	94	93	1821	1828
6 Isoamyl dodecanoate	-	92	-	1846	1844
7 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	-	-	96	1846	1846
8 2-Heptadecanone	-	-	95	1896	1906
9 Methylhexadecanoate	95	91	93	1929	1925
10 Ethylhexadecanoate	92	83	94	1992	1993
11 Isopropylhexadecanoate	90	90	90	2025	2024
12 Abietatriene	84	81	83	2085	2075
13 Octyldodecanoate	86	84	83	2102	2158
14 2-Nonadecanone	-	-	92	2108	2106
15 Methyl octadecanoate	90	92	90	2130	2124
16 Dodecyl octanoate	95	91	-	2175	2177
17 n-Butylhexadecanoate	92	93	90	2198	2188
18 Octyltetradecanoate	83	85	-	2302	2359
19 Tetradecyl octanoate	84	90	-	2380	2375
20 n-Butyloctadecanoate	84	88	87	2395	2388
21 Pentadecyl octanoate	-	85	84	2477	2475
22 Octylhexadecanoate	83	84	83	2504	2505
23 Di(ethylhexyl) phthalate	95	93	94	2542	2550
24 1-Tetracosanol	-	-	92	2697	2710
25 Squalene	93	93	-	2828	2847
26 1-Hexacosanol	91	-	92	2884	2877
27 Tetradecyltetradecanoate	81	81	89	2968	2950

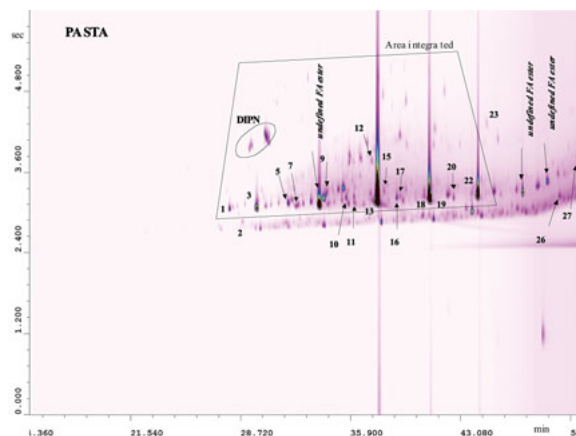


Fig. 2 パスタMOAH分画のGC×GC-MSクロマトグラム (同定結果はTable 2に記載)
undefined FA ester: 未確定脂肪酸エステル、
DIPN: diisopropyl naphthalenes, Area integrated: 積分領域

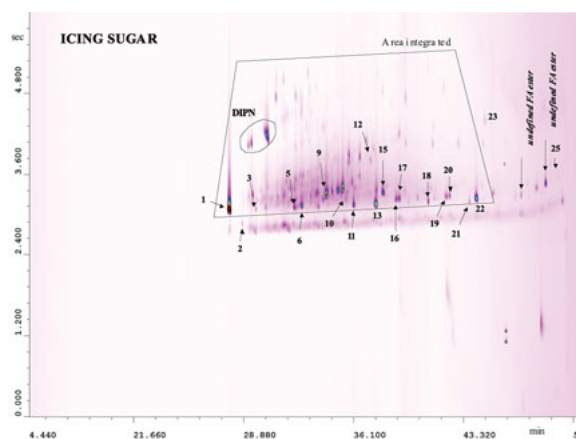


Fig. 3 粉砂糖MOAH分画のGC×GC-MSクロマトグラム (同定結果はTable 2に記載)

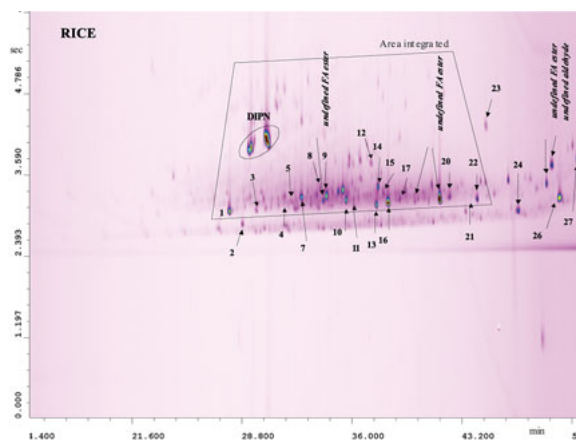


Fig. 4 米MOAH分画のGC×GC-MSクロマトグラム (同定結果はTable 2に記載)

この研究では、いわゆるMOAH “cloud”の中にある芳香族化合物同定は行っていない。これらの成分は量が非常に少なく、實際上、信頼性の高い同定は不可能であると考えられる。しかし、(FID分析による) MOAHの定量と汚染物源を特定するのに極めて重要なパターン決定はできた。

MOAH分画に存在する一連のピークは、エステル化脂肪酸と同定された。全MOAH面積の算出にあたっては、これらの化合物を減算したので、これらのピークが存在していても定量の信頼性に影響を与えてはいない。エステル化脂肪酸はボール紙の梱包によるものであった。実際、箱梱包される前に測定されたパスタ試料にはMOAH汚染の兆候は見られなかった。

植物油をベースにしたオフセット印刷インクが15年以上前から使用されるようになってきているが、ボール紙からの汚染が懸念されるようになってから、その使用は増加している。

GC×GC-MSクロマトグラムの“未知”化合物に “undefined FA esters”とラベルしているものがある。これは相対スペクトルより明らかに脂肪酸エステルと判断できたためである。つまり、データベース検索では高い一致度で別の同族化合物としてヒットしたが、対応する保持指標が一致しなかったものである。したがって、十分な信頼性でこれらの化合物は同定できたとはいえないが、化合物と性質としては明らかなので、図中にその旨を記載した。また、MSデータベースに含まれていないもので、除外できないものもあった。例えば、パスタの試料 (Fig. 2) では、4つの主要ピークのうち、octyldodecanoate, octyltetradecanoateとoctylhexadecanoateの3種類を同定している。octyldecanoateは、使用MSデータベースには登録がなく“undefined FA ester”であったが、2次元の位置から、高い確度でその化合物であろうと判断した。このスペクトルは、NISTウェブサイトでも報告されているスペクトルと視認上非常に高い一致を示したが、LRIの情報がないため、この化合物についての不確定性は残っている。

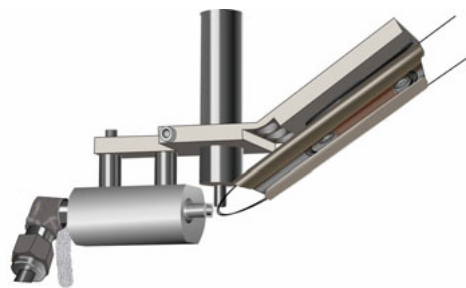
解析を行ったすべての試料で、実質上、同じ化合物が見つかることは注目に値する。しかし、その量に相違が見られることから、おそらくインクのタイプや汚染源に違いがあると考えられる。植物油オフセット印刷のインクがパスタの(汚染が多い) 梱包材に直接使用され、また、他の2つの食品試料については量が異なることから、リサイクル繊維の中に使用されていると考えられる。

References

[1] K.Grob, M. Biedermann, A. Caramaschi, B. Pacciarelli, J. High Resolut. Chromatogr. 14 (1991) 33-39.
[2] Ch. Droz, K. Grob, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 205 (1997) 239-241.
[3] M. Biedermann, Y. Uematsu, K. Grob, Packag. Tech. Sci. 24 (2011) 61-73.
[4] M. Biedermann, K. Grob, Eur. Food Res. Technol. 230 (2010) 785-796.
[5] A. Vollmer, M. Biedermann, F. Grundböck, J. E. Ingenhoff, S. Biedermann-Brem, W. Altkofer, K. Grob, Eur. Food Res. Technol. 232 (2011) 175-182.

[6] M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A 1255 (2012) 76-99.
[7] German Federal Institute for Risk Assessment (BfR). Stellungnahme Nr. 008/2010 des BfR vom 03, December, 2009.
[8] Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) 2002, 59th report, 11-20; WHO Technical report Series 913, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_913.pdf.
[9] European Food Safety Authority (EFSA), Scientific opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food, EFSA Journal 10(6) (2012) 2704 1-185.
[10] Summary and conclusion of the 76th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 29 June 2012.
[11] A. Guinda, A. Lanzòn, T. Albi, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 1723-1726.
[12] O. Koprivnjak, G. Procida, L. Favretto, Food Technol. Biotechnol. 95 (1997) 125-131.
[13] Y.A. Tan, and A. Kuntom. J. AOAC Int. 76 (1993) 371-376.
[14] A.S. McGill, C.F. Moffat, P.R. Mackie, P. Cruickshank, J. Sci. Food Agric. 61 (1993) 357-363
[15] C. Wagner, H.-P. Neukom, K. Grob, S. Moret, T. Populin, L.S. Conte, Mitt. Lebensm. Hyg. 92 (2001) 499-514.
[16] K. Grob, Workshop EU-DG-SANCO and the KLZH, Switzerland (2008).
[17] D. Fiorini, A. Paciaroni, F. Gigli, R. Ballini, Food Control, 21 (2010) 1155-1160.
[18] S. Moret, L. Barp, K. Grob, L.S. Conte, Food Chem. 129 (2011) 1898-1903.
[19] K. Grob, A. Artho, M. Biedermann, J. Egli, Food Addit. Contam. 8 (1991) 437-446.
[20] M. Biedermann, K. Fiselier, K. Gob, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 8711-8721.
[21] P.Q. Tranchida, M. Zoccali, G. Purcaro, S. Moret, L. Conte, M. Beccaria, P. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A, 2011, 1218, 7476-7480.
[22] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, J. Chromatogr. A, 1255 (2012) 100-111.
[23] M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A 1255 (2012) 56-75.
[24] S. Moret, L. Barp, G. Purcaro, L.S. Conte, J. Chromatogr. A, 1243 (2012) 1-7.
[25] <http://www.bfr.bund.de/cm/349/determination-of-hydrocarbons-from-mineral-oil-or-plastics.pdf>, BfR (2012).
[26] M. Biedermann, K. Grob, J. Sep. Sci. 32 (2009) 3726-3737.
[27] L. Mondello, M. Zoccali, G. Purcaro, F.A. Franchina, D. Sciarrone, S. Moret, L. Conte, P.Q. Tranchida, J. Chromatogr. A, 1259 (2012) 221-226.

島津 GC×GC-MSシステム



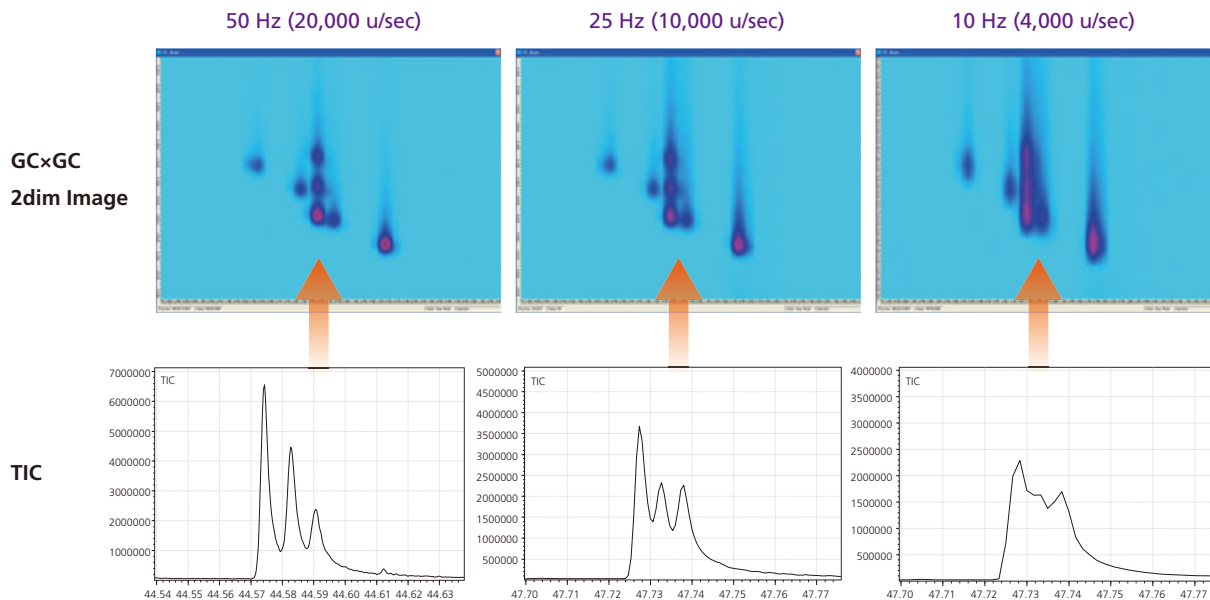
優れたモジュレーションを実現する
Zoex ZX1 2段階サーマルモジュレータ



最大 20,000 u/sec でスキャン可能な
高速四重型ガスクロマトグラフ質量分析計
GCMS-QP2010 Ultra

脂肪酸の2次元クロマトグラムとスキャン速度

GCMS-QP2010 Ultraの高速性は2次元側の分離能を向上させる効果があります。
これにより高感度で扱いやすい経済的な四重型MSがGC×GCに利用しやすくなります。



株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2013年10月
© Shimadzu Corporation, 2013