缶コーヒーの内層コーティングに含まれる成分の ノンターゲット分析

Non-Target Analysis to Identify Compounds in the Inner Coating of Canned Coffee

田村昌之・山本敦史*

Masayuki TAMURA and Atsushi YAMAMOTO

公立鳥取環境大学環境学部 Faculty of Environmental Studies, Tottori University of Environmental Studies

Compounds included in the inner coating of canned coffee were analyzed with liquid chromatography/mass spectrometry. The mass spectrometer was a hybrid quadrupole and time-of-flight type and run data-dependent acquisition mode that acquired fragment ions for features with sufficient abundance. Interpretation of the data revealed the adsorption of food-derived compounds in the inner coating, as well as byproducts and additives of polymer. In addition to the presence of ethylene terephthalate cyclic oligomers, the presence of antioxidants such as 2,2'-(1-methylcyclohexyl)-p-cresol was confirmed. The finding can be valuable for feature health risk assessment of food contact materials.

(Received May 7, 2020; Accepted June 29, 2020)

1. 序 論

健康被害をもたらす食品に含まれる有害物質への関心は高く、これらには食品成分自身あるいは添加物に限らず、食品に関連して用いられる器具や食品の容器包装から食品に非意図的に移行する化学物質も含まれる。器具や容器包装に用いられるものは食品接触材料と呼ばれ、これまで日本国内では安全性に懸念のあることが判明した物質について食品衛生法に基づき規格基準が設定されているほか、食品業界の自主規制によって安全性の確保が取り組まれてきた。さらには2020年6月から器具・容器包装のポジティブリスト制度が施行され、取り組みは新たな段階に入る。現在、ポジティブリストには1,400を超える物質の収載が検討され、使用量の多いものや生体への毒性等が懸念される添加剤については一斉に分析が可能となる手法の確立も期待されている。膨大な数の分析対象物質を同時に分析できる手法として質量分析(MS)は最も期待されている方法であるが、明確な分析対象物質に対して安全性が評価できればそれで済むかと言うと必ずしもそうとは限らない。実際、新たな取り組みにも食品接触材料が製造工程等で化学的に変化して生成される物質は含まれない。質量分析は多くの分析対象成分の量を同時に評価するだけでなく、どのような成分が含まれているかを明らかにするためにも用いることができる。特に、近年ユーザーが急激に増えて

いる四重極と飛行時間型やフーリエ変換型を組み合わせたハイブリッド型高分解能質量分析計は、クロマトグラフィーと併せることで保持時間情報と精密質量でのフラグメンテーション情報を与える。検出されるイオンについてこれらの情報を総合的に解釈することで化合物が同定できると、食品の安全に対しても現在の取り組みで不足している面を補完できる可能性がある¹⁾。事前に分析対象を限定しない手法はノンターゲット分析といわれ、イオン化が困難な物質には適用できないといった質量分析自体における課題もある一方で、これまでとは異なる観点からの知見が得られる手法として食品の安全性のための分析分野においても期待が高まっている。今回、缶コーヒーについてその容器から飲料に移行する可能性がある成分についての探索を高分解能質量分析により行った手順について報告する。

2. 実 験

缶コーヒー(ミルク入り)は同一ブランドで販売されているスチール製ダイヤカット2ピース缶と通常のスチール製3ピース缶のものを2019年9月と10月に鳥取市内で購入した。使用後の缶を130 mLの水で5回すすぎ、60°Cで6.5時間乾燥させた後、アセトンを10 mL加えた。缶を振盪機(EYELA CUTE MIXER CM-1000)により1,500 rpmで15分間振盪した。アセトンを回収し、メタノールで100倍、1,000倍、10,000倍に希釈し、それらを液体クロマトグラフ質量分析計(SCIEX ExionLC AD/X500R)により分析した。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化とし、正イオン・負イオンモード、Data dependent acquisition (DDA) モードで測定した。共に、MSで m/z 100–800の測定を0.1 s行うとともにシグナル強度上位10イオンについてMS/MS測定した。カラムには逆相ODSカラム(CERI, L-

* Correspondence to: Atsushi YAMAMOTO, Faculty of Environmental Studies, Tottori University of Environmental Studies, 1-1-1 Wakabadai-kita, Tottori, Tottori 689-1111, Japan, e-mail: ay@pfos.jp
山本敦史, 公立鳥取環境大学環境学部, 〒689-1111 鳥取市若葉台北1-1-1

図1. 液体クロマトグラフ質量分析計データ (A: 溶媒のみ, B: 2 ピース缶試料).

column2 ODS, 2.1 mm×150 mm, 2 μ m) を用い, 移動相は両方に 2 mM 重炭酸アンモニウムを含む水 (A) とメタノール (B) の二液を用いた. グラジエントは流速を 0.2 mL/min とし, B 5% (0 min)→5% (3 min)→100% (8 min)→100% (18 min)→5% (18.1 min)→5% (23 min) の設定とした. DDA のデータは MSConvert²⁾ を用いてプロファイルデータからセントロイドデータに変換しファイル形式を mzml とした. 変換したデータは MS-DIAL³⁾ で読み込み, 缶抽出液の分析において MS/MS を取得したイオンについて, ブランクとして溶媒を分析した結果と違いのあるものを抽出した.

水は超純水製造装置 (ELGA, PURELAB flex3) で製造したものを用いた. アセトン, メタノールは関東化学から購入した残留農薬分析グレードと LC/MS グレードのものをを用いた. Ethylene terephthalate cyclic dimer, ethylene terephthalate cyclic trimer は Toronto Research Chemicals から購入した. 2,2'-Methylenebis[6-(1-methylcyclohexyl)-p-cresol] は東京化成から購入した.

3. 結果と考察

3.1 検出された各イオンについての保持時間と精密質量を用いた構造解析

装置ブランクとして分析した溶媒と抽出した試料の希釈液についてアラインしたピークのうち, MS/MS が取得されているものは正イオンモードが 403 個, 負イオンモードが 231 個であった. これらの多くはブランクでも検出されるピークであった. 溶媒のみの測定と缶から抽出した試料の希釈液の正イオンモード MS 測定の結果を図 1 に示す. グラフの縦軸を m/z , 横軸を保持時間とし, 強度が大きなイオンほど白く表示されるように配色した. 最も明るい色

図2. PET 環状三量体のプロトン付加分子, アンモニウムイオン付加分子, ナトリウムイオン付加分子の抽出イオンクロマトグラム.

と配色する強度の最大強度に対する比率を 16% から 8%, 4% と半分ずつにしながら, 溶媒のみの測定した時のデータと目視で比較して缶容器から溶出した試料からのみ検出されるイオンを探索した. MS-DIAL で抽出されたピークを元に, 保持時間や m/z が等間隔で並ぶピークを関連がある化合物群として解析した. 3 ピース缶については, いくつか検出される成分に違いがあったものの, 主要なイオンは 2 ピース缶から得られたものと同様であったため本論文では説明しない.

2 ピース缶のみで検出されたピークについて, 正イオンモードで最も強度の強いピークを P1 とし, 以下 P2, P3 とラベル付けした. また, それぞれに関連するピークを P1' のように記載した. P1 は保持時間 10.8 分, m/z 594.1613 で

表1. 検出されたイオンと保持時間, フラグメントイオンの精密質量

	m/z	Retention time/min	Ionic form	Molecular formula of neutral	Exact mass of the ionic form	Fragment	Confidence level ¹²⁾	Remark
P1	594.1613	10.8	$[M + NH_4]^+$	$C_{30}H_{24}O_{12}$	594.1606	121.0289, 149.0241, 175.0403, 193.0507, 325.0716, 533.1088	1	Ethylene terephthalate cyclic trimer.
P1'	402.1199	10.6	$[M + NH_4]^+$	$C_{20}H_{16}O_8$	402.1183	149.0243, 175.041, 193.0502, 297.0389, 341.0671	1	Constant m/z interval 192.04 from P1. Ethylene terephthalate cyclic dimer.
P1''	786.2041	11.5	$[M + NH_4]^+$	$C_{40}H_{32}O_{16}$	786.2029	149.0240, 193.0506	1	Constant m/z interval 192.04 from P1. Ethylene terephthalate cyclic tetramer.
P2	359.3162	13.4	$[M + H]^+$	$C_{21}H_{42}O_4$	359.3156	57.0704, 71.0861, 85.1013, 95.0856, 109.1020	3	MG (18:0/0/0) or MG (0/18:0/0)
P2'	331.2846	12.4	$[M + H]^+$	$C_{19}H_{38}O_4$	331.2843	57.0701, 71.0867, 149.0250	3	MG (16:0/0/0) or MG (0/16:0/0)
P2''	656.5832	14.3	$[M + NH_4]^+$	$C_{39}H_{74}O_6$	656.5824	239.2388, 355.2862, 383.3160, 411.3465, 551.5032	3	TG
P3	558.2868	10.8	$[M + NH_4]^+$	$C_{34}H_{36}O_6$	558.285	107.0503, 133.0659, 135.0811, 191.1076, 257.1194, 285.1493, 297.1495	3	Cyclo-BADGE-BFDGE
P3'	530.2553	10.6	$[M + NH_4]^+$	$C_{32}H_{32}O_6$	530.2537	107.0497, 133.0656, 145.0662, 163.0755, 257.1189	3	Constant m/z interval 28.031 from P3. Cyclo-di-BFDGE.
P3''	586.318	10.9	$[M + NH_4]^+$	$C_{36}H_{40}O_6$	586.3163	107.0503, 133.0659, 135.0816, 173.0979, 191.1084, 285.1506, 325.1818, 419.2246	3	Constant m/z interval 28.031 from P3. Cyclo-di-BADGE.
P4	315.2326	13.2	$[M + H]^+$	$C_{21}H_{30}O_2$	315.2319	109.1025, 117.0704, 131.0861, 133.1014, 159.1181, 173.1328, 185.1366, 223.1493, 253.1980	3	Methyl dehydroabietate
P4'	317.2486	14.5	$[M + H]^+$	$C_{21}H_{32}O_2$	317.2475	93.0710, 107.0868, 121.1025, 123.1180, 135.1174, 201.1635, 257.2249	3	Methyl abietate
P5	195.0879	8.1	$[M + H]^+$	$C_8H_{10}N_4O_2$	195.0877	69.0457, 83.0614, 110.0720, 123.0436, 138.0670	2	Caffeine
P6	438.3391	14.1	$[M + NH_4]^+$	$C_{29}H_{40}O_2$	438.3367	121.0657, 217.1599, 403.3074	1	Cation of N1
N1	419.2997	14.3	$[M - H]^-$	$C_{29}H_{40}O_2$	419.2956	203.1437, 313.2566, 387.2759, 403.2710	1	2,2'-Methylenebis[6-(1-methylcyclohexyl)- <i>p</i> -cresol]
N2	579.3399	11.7	$[M - H]^-$	$C_{28}H_{52}O_{12}$	579.3386	179.0559, 255.2330, 269.2484, 297.2442, 341.1099	3	Sucrose palmitate
N3	539.2448	10.9	$[M - H]^-$	$C_{34}H_{36}O_6$	539.2439	93.0341, 149.0617, 199.0772, 227.1080, 255.1028, 283.1340	3	Anion of P3

あった。図2に示すように同一のクロマトグラムのピーク形状で17.026質量の小さな m/z 577.1357, 4.957大きな m/z 599.1179も検出されていた。プロトン付加分子, アンモニウム付加分子, ナトリウムイオン付加分子の精密質量差はそれぞれ17.026, 4.957であることから, P1はアンモニウムイオン付加分子であり, 対応する中性分子の分子式は $C_{30}H_{24}O_{12}$ と考えられた。フラグメントイオンを表1に示す。図1に示すように, P1に関して等しい m/z 間隔192.04で並ぶピーク (P1', P1'') が検出されていた。これらには m/z 193.051である共通のフラグメントイオンもあることから, 同じ繰返し単位をもつオリゴマーと考えられた。フラグメントイオンには C_2H_4O に相当する44.026差をもつイオンがあり, 繰返し単位 $C_{10}H_8O_4$ の水素不足指数は7であることを考えると, 高い水素不足指数を C_2H_4O を除いた残りの分子式 $C_8H_4O_3$ で満たすにはフェニレンと二つのカルボニル基が必要であり, ポリエチレンテレフタレート (PET) の環状三量体と考えるのが最も妥当である。PET樹脂の不純物として環状オリゴマーが含まれることはこれ

までも知られており⁴⁾, 今回用いた2ピース缶容器内層にはPET樹脂がコートされていると考えられた。飲料缶にPETフィルムがラミネートされた鋼板から2ピース缶が製造されており⁵⁾, 今回測定した缶はそれに該当すると考えられた。Harrisonらが環状オリゴマーのプロダクトイオンスペクトルを報告⁶⁾しており, 今回得られたフラグメントイオンは報告例 (m/z (相対強度)), 149 (100), 192 (76), 385 (32), 577 (26)) と一致していた。PETはその結晶化特性を調整するために, テレフタル酸にイソフタル酸を混ぜPETコポリマーとして用いられることが増えている⁷⁾。図2における三量体のメインのピークの前に検出されているピークはイソフタル酸構造を含む異性体と考えられた。

P2は保持時間13.4分の m/z 359.3162であった。フラグメントイオンからアルキル基が含まれる分子であり, 中性分子の分子式は $C_{21}H_{42}O_4$ と考えられた。フラグメントイオンから, 物質を推定するサービスを提供しているMAG-Ma⁸⁾を用いて, 構造データベースをHuman Metabolome

Databaseとして構造推定するとモノステアリンが候補として挙げられた。MassBank of North AmericaのFiehnHIL-IC001606にモノステアリンの正イオンESIによるプロダクトイオンスペクトルが掲載されていた。掲載のスペクトルの強度は弱いものの、今回見られたフラグメントは一致しており、モノステアリンと考えられた。このイオンの周辺には、図3に示すようにアルキル鎖長の異なるイオン(P2' 保持時間12.4分, m/z 331.2846や保持時間11.6分, m/z 303.2538)や、アシル基の数の違うもの(P2'' 保持時間14.3分, m/z 656.5832や保持時間14.9分, m/z 682.5991)も検出されており、飲料に含まれている乳脂肪分等で缶のコーティングに吸着した成分が検出されたと考えられた。

P3は保持時間10.8分に検出された m/z 558.2868であった。フラグメントイオンの分子式に矛盾しないP3の中性分子の分子式は $C_{34}H_{36}O_6$ と考えられた。P3の保持時間の周辺には図4に示すように m/z 28.031違いのイオンP3', P3''が検出されており、表1に示すように共通のフラグメントイオンも検出されていた。P3''のフラグメントイオン285.1506はプリカーサーイオンからアンモニアを除いた中性ロスが284.1408であり、それぞれ $C_{18}H_{21}O_3$, $C_{18}H_{20}O_3$ であると考えられ、対称性の高い分子であることがわかる。また、 C_7H_7O , C_9H_9O といったフラグメントイオンからアルキルフェノール様の構造も含まれると考えられた。P3の中性分子 $C_{34}H_{36}O_6$ と缶、コーティングというキーワードで検索エンジンGoogleを用いて検索しても関連する情報は見られなかったが、P3''の中性分子 $C_{36}H_{40}O_6$ の場合、

ビスフェノールAのジグリシジルエーテル (BADGE) 誘導体に関する情報が得られた。その一つ、Cyclo-di-BADGEの分子式は $C_{36}H_{40}O_6$ である。Bergerらは、缶のコーティングに用いられるエポキシ樹脂についての研究で、Cyclo-di-BADGEのプロダクトイオンスペクトルについて報告している⁹⁾。P3''のプロダクトイオンスペクトルはBergerらによる報告(m/z (相対強度), 191 (10), 265 (30), 285 (60), 325 (50), 387 (20), 419 (10), 441 (10), 457 (10), 553 (100))と一致しており、これはCyclo-di-BADGEである可能性が高い。また、近年はビスフェノールAではなく、メチル基二つ少ないビスフェノールFが代替物質として用いられ始めている¹⁰⁾。仮に、ビスフェノールAに加えてビスフェノールFがエポキシ樹脂の原料として用いられると図5のP3, P3'のように C_2H_4 分だけ質量の小さな分子が生成する可能性がある。

P4は保持時間13.2分に見られた m/z 315.2326であった。フラグメントイオンの水素不足指数は大きく、多くの環状構造を持つと考えられた。フラグメントイオンの分子式に矛盾しないP4の中性分子の分子式は $C_{21}H_{30}O_2$ と考えられた。分子式からだけではプロゲステロン等のC21ステロイドも候補であるが、内層コーティングの成分として使われるとは考えられない上に、MassBank (UF415102, SM872401) に収載されているプロダクトイオンスペクトルとは一致しなかった。類似の分子式のものとして、アビエチン酸誘導体も考えられた。デヒドロアビエチン酸メチルであれば分子式は一致する。デヒドロアビエチン酸のプロダクトイオンスペクトル

図3. モノアシルグリセロールのプリカーサーイオンの抽出イオンクロマトグラム。

図4. ビスフェノールグリシジルエーテルのプリカーサーイオンの抽出イオンクロマトグラム。

図5. フラグメントの解析から得た構造式。

図6. 標準液と缶溶出液のプリカーサーイオンの抽出イオンクロマトグラム. 図中右上は標準液から取得したプロダクトイオンスペクトル (a: PET環状三量体P1, b: 2,2'-メチレンビス[6-(1-メチルシクロヘキシル)-*p*-クレゾールN1])

ルはMassBank (NGA00691) にあり、P4で見られたものと一致していた。P4'はアビエチン酸のプロダクトイオンスペクトルに似ており、これらはデヒドロアビエチン酸メチル、アビエチン酸メチルである可能性がある。

P5は保持時間8.1分、 m/z 195.0879であり、カフェイン $C_8H_{10}N_4O_2$ と考えられた。プロダクトイオンスペクトルもMassBank (EA030313) と一致していた。

負イオンモードについても同様にN1, N2とラベル付けた。N1は保持時間14.3分に見られた、 m/z 419.2997であった。フラグメントイオンの分子式に矛盾しないN1の中性分子の分子式は $C_{29}H_{40}O_2$ と考えられた。フラグメントの一つに m/z 203.1437があり、対応する中性ロス216.1560である。分子式はそれぞれ、 $C_{14}H_{19}O$, $C_{15}H_{20}O$ であり、これも対称性の高い分子であると考えられた。P6はこのN1と同じ中性分子から生じていると見られ、フラグメントイオンには C_7H_{13} や C_8H_9O があり、不飽和アルキ

ル基、あるいは環状構造、そしてフェノール状の構造が含まれると考えられた。ChemSpiderに収載されている分子式が $C_{29}H_{40}O_2$ であるものの中から、構造が最も条件が一致するものを探すと2,2'-メチレンビス[6-(1-メチルシクロヘキシル)-*p*-クレゾール]が該当した。これは酸化防止剤用途のほか、屈曲亀裂防止および金属害防止のために用いられる¹¹⁾。N2は保持時間11.7分に見られた m/z 579.3399であった。フラグメントには $C_{12}H_{21}O_{11}$, $C_6H_{11}O_6$ に特徴づけられる糖の構造のほか、パルミチン酸に相当する $C_{16}H_{31}O_2$ があることから、パルミチン酸スクロースと考えられた。乳化剤にも用いられる物質である。P1, P1', N1については標準物質を用いて、試料中から検出された保持時間およびプロダクトイオンスペクトルが一致することを確認した(図6)。

3.2 ノンターゲット分析による構造推定のための手順

今回示した構造を考察する上での手順は物質によってさまざまであるが、イオンがどのような形で検出されているかを明らかにすることが第一段階である。ほかにどのようなアダクトイオンが見えているか、極性を変えたときに同じ保持時間に矛盾しないイオンが見えるかで確認する。精密質量やアイソトポログのパターンから分子式が計算できるが、高質量側では候補の数も非常に多くなる。フラグメントイオンの精密質量からも分子式を計算して、矛盾される候補を除外する。プリカーサーイオンの分子式を明らかにできれば、多くの場合解析はうまくいくことが多い。不明な場合はMAGMaでプリカーサーイオンとフラグメントイオンの精密質量のみからでも元の分子を探すこともできる。MAGMaはデータベースにPubChemも選択することができ、それまで考慮に入れていなかった元素も含めて分子式を探すことができる。次の段階はフラグメントイオンに、特徴的なものがあるかを探す。繰返し構造が読み取れるものがあると構造を読む上でわかりやすい。推定された分子式の水素不足指数からどのような部分的な構造が可能であるかを、小さなフラグメントから順に考えて元の分子を組み立てていく。ESIで生じるプリカーサーイオンはプロトン付加、ないし脱離分子等水素不足指数が端数を持つものがほとんどである。フラグメントイオンについても水素不足指数が整数となるのは SO_3^- といった特徴的なイオンや環式化合物が開裂する際等、限られた場合になる。中性ロスについても水素不足指数は構造を考える上での参考になるが、フラグメンテーションに伴う H_2 の脱離もありうる。プリカーサーイオンがアダクトイオンとして生成している場合等、水素不足指数を正の値に限定する等の制約をかけると正解を見落とすこともあり、環・二重結合の数も含めて柔軟に考えて構造を推定の方が良い。利用可能なMS/MSのライブラリは圧倒的に不足しており、似た構造のものから推定する。かき集めた断片的な構造情報に加え、工業的な合成経路等の知識や、規制や代替物質の動向などもデータを総合的に読む上で活用する。推定された構造について、アルキル鎖長が異なるといった同族体をデータから探し、保持時間で矛盾しないピークが見られて

いれば推定した構造の信頼性を高めることができる。ノンターゲット分析により、今回検討した缶の内層コーティングにはPET樹脂が用いられていると考えられたが、2ピース缶と3ピース缶で検出されるイオンでは樹脂の副生成物や添加剤に一部違いがあった。含まれた樹脂の副生成物や添加剤は、必ずしも飲料中に溶出するわけではなく、健康リスクを評価するためには、見つけることができた物質について食品疑似溶媒を用い、溶出量や摂取量を見積もる必要がある。

謝 辞 本研究はJSPS科研費17H00796の助成を受けた。

文 献

- 1) C. Nerin, P. Alfaro, M. Aznar, and C. Domeño, *Anal. Chim. Acta*, **775**, 14 (2013).
- 2) R. Adusumilli and P. Mallick, "Proteomics—Methods and Protocols," ed. by L. Comai, J. E. Katz, and P. Mallick, Springer Verlag, Berlin (2017), Chap. 23, p. 339.
- 3) H. Tsugawa, T. Cajka, T. Kind, Y. Ma, B. Higgins, K. Ikeda, M. Kanazawa, J. VanderGheynst, O. Fiehn, and M. Arita, *Nat. Methods*, **12**, 523 (2015).
- 4) T. H. Begley and H. C. Hollifield, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 468 (1989).
- 5) 葛良忠彦, "機能性包装の基礎と実践," 日刊工業新聞社, 東京 (2011), p. 223.
- 6) A. G. Harrison, M. J. Taylor, J. H. Scrivens, and H. Yates, *Polym.*, **38**, 2549 (1997).
- 7) 佐多永行, "ポリエチレンテレフタレートについて," PETトレイ協議会, "ペットボトルリサイクルの在り方検討会への事業者からの意見," 日本容器包装リサイクル協会, 2017.
- 8) L. Ridder, J. J. J. van der Hooft, S. Verhoeven, R. C. G. De Vos, E. Van Schaik, and J. Vervoort, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**, 2461 (2012).
- 9) U. Berger and M. Oehme, *J. AOAC Int.*, **83**, 1367 (2000).
- 10) 植松洋子, 平田恵子, 飯田憲司, 齊藤和夫, 食品衛生学雑誌, **41**, 23 (2000).
- 11) M. Ash and I. Ash, "Handbook of Preservatives," Synapse Information Resources Inc, New York (2004), p. 137.
- 12) E. L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. P. Singer, and J. Hollender, *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 2097 (2014).

Keywords: Food contact materials, High-resolution mass spectrometry, Non-target analysis