

容器密封性評価のための迅速 LC/MS 検知法

隅谷 栄伸, 大木 伽耶子

A Fast Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for Assessing the Sealing Performances of Containers

Hidenobu Sumitani and Kayako Ogi

A fast new liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method was developed for assessing the sealing performances of beverage containers exposed to ultrahigh pressures. The method involved filling a container with pure water, placing the container in a pouch filled with water containing an organic compound, then applying a high pressure to the pouch. The amount of organic compound that had been transferred from the pouch to the container was then determined by LC/MS. In experiments, the organic compound was detected in bottled water that had been incompletely sealed, suggesting that the method is a useful way of evaluating the sealing performances of bottles. Quantifying the organic compound allowed the amount of water that migrated from the pouch to the container to be estimated, meaning that the method could be used to assess risk. The method could be used not only for high-pressure treatments but also for heat sterilization treatments. The method could also be used for different types of containers, such as glass bottles, retort pouches, and cans. The method could therefore be widely used to assess the sealing performances of heat-sealed containers and containers with different seals.

Key words: ultrahigh pressure, package, bottle, LC/MS, organic acid, citric acid

食品や医薬品の安全性確保のため、包装容器の気密性や密封性は重要な評価項目の一つである。例えば、プラスチックボトルのキャップ密封性試験では、落下試験、瞬間耐圧試験、サーマルショック試験、振動試験など様々な方法により漏れの有無を確認している。しかし、殺菌中の密封性評価においては公定法がなく、食品や容器メーカーの自主検査により安全性の確認を行っているのが現状である。その理由は、殺菌中の漏れに対する適当な評価手段が無いと思われる。加熱殺菌の場合、急激な加熱と冷却で起こる僅かな密封性の変化によるマイクロイミグレーションの問題が発生する恐れがある。そのため、微生物の吸い込み試験や呈色反応を利用した検査方法が非公式にあるようだが、微生物試験は、菌の培養や試験前後の設備殺菌など手間のかかる試験となることや、呈色反応においては発色が不安定で精度が悪いことが問題視されている。また近年、食品の調理や賞味期限延長を目的として、加熱処理だけでなく超高压処理技術が実用化されてきている。その加圧過程で、処理装置内の外気や水を吸い込む恐れがあり、マイクロイミグレーションの問題を無視できない。国内では 200 MPa を超える超高压条件下で容器が処理されることはほとんど無く、その密封性の検査や評価に関する知見が見あたらない。そこで高压処理中の密封性を評価する方法を考案したので報告する。

実験方法

1. 試料の調製

(1) 高压試験用 PET ボトル水の調製

250 mL 容量の角形 PET ボトル（東洋製罐製）にイオン交換水を充填し、スクリュー式キャップで巻き締めした。その際の巻き締め角度を 345°, 365°, 385° の 3 通りで行い、更に密封不良のモデルとして、木綿糸（太さ 283 μ m）をキャップに噛み込ませた試料も合わせて調製した。

(2) 超高压処理条件

種々の容器に充填した水試料を 20w/v% クエン酸（和光純薬工業、食品添加物用、純度 99.5% 以上）水溶液で満たしたパウチに入れ、ヒートシールを行った（ 1）。超高压装置 Hyperbaric135（Hyperbaric 社製）を用い、圧力 600 MPa（2 分間）、水温 22 ~ 23°C、昇圧速度 180 MPa/min の条件で超高压処理を行った。



図1 パウチ詰め後のボトル詰め水試料

(3) 試料採取方法

処理後の試料をパウチから取り出し、表面のクエン酸水溶液をふきとった後、表面に残った水分をさらに室温で一晩乾燥させた。乾燥後、ボトル底部に半田ごてで穴を開け(図2)、パストツールピペットを用いてボトル中の水の一部をサンプルビンに移し換え、LC/MS用の試料溶液とした。



図2 LC/MS用試料の分取方法

2. LC/MS分析

(1) 分析条件

LC装置には1260 Infinity Series (アジレントテクノロジー製)を、MS装置には6430 Triple Quad LC/MS (アジレントテクノロジー製)を用いた。カラムはZORBAX SB-C18 (φ1.8μm, 2.1 × 50 mm, アジレントテクノロジー製)、移動相は0.1%ギ酸を用い、流速0.4 mL/minのアイソクラティックで送液した。フラグメンター電圧を75 V、乾燥窒素ガス(350°C)を毎分12 L、ネブライザー圧を60 psig、キャピラリー電圧を3500 Vとした。オープン温度は40°Cで、注入量5 μLとし、オートサンプラーのサンプルトレイ温度は4°Cに保持した。イオン化法はESI法で、選択イオンモニタリング法(m/z 191.1)を用い、Negative検出モードで1分間、測定を行った。また、1 ppmのクエン酸標準溶液の測定データからS/N比を求め、S/N比の3倍を検出限界として算出した。

(2) クエン酸検量線の作成

クエン酸試薬(和光純薬工業、特級、純度>98%)を用いて、1, 5, 10 ppmの標準水溶液を調製した。0.45 μLのメンブランフィルタでろ過後、測定に供した。得られたクエン酸由来シグナル(m/z 191.1)の積分値から検量線を作成した。

(3) 測定試料の調製

分取した処理後試料を、メンブランフィルタにかけずに測定に供した。クエン酸が高濃度に検出された試料については、検量線濃度上限に入るように適宜試料を希釈し、測定を行った。

実験結果および考察

1. 検出物質の選考

本手法の原理は、水を充填した容器を高濃度な特定の物質が入ったパウチに入れ、密封し、高圧処理後に、容器内に特定物質が混入しているかどうかを分析評価するというものである。検出物質の要件として、水溶性が高く¹⁾、LC-MSに対する検出感度が高い物質が有効である。高濃度で用いるため、物質の入手が容易で安価であることも要件に加えると、食品の糖、アミノ酸、有機酸などの一般成分が有用と考えた。糖は水溶性が高いが、LC-MSに対する感度が非常に悪い。アミノ酸や有機酸はLC-MSに対して高感度で、その中でもクエン酸は非常に水溶性が高いことから、クエン酸を検出物質とし、以後の実験を行った。

2. 分析条件の検討

今回の測定評価では、分析対象物質がクエン酸と決まっており、不純物の少ない水中でのLC/MS測定であることから、測定時間短縮のため、長さが50 mmの比較的短い逆相カラムを使用した。得られるクロマトグラムの例として、クエン酸標品(1.0 ppm)および純水のm/z 191.1の選択イオンクロマトグラムを示した(図3)。測定は1分以内で終わる。

0.1 ~ 10 ppmの範囲で検量線を作成した結果を図4に示す。本試験法での検出限界は0.05 ppm以下であった。

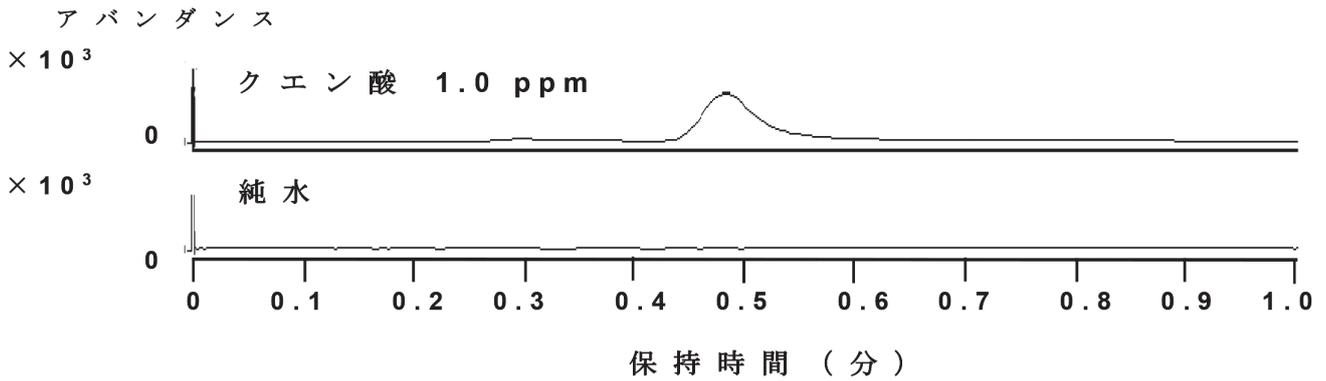


図3 クエン酸標品および純水の m/z 191.1 選択イオンクロマトグラム

表1 高圧処理した PET ボトル中のクエン酸濃度測定結果

巻締角度	処理	クエン酸濃度 (ppm)
345		nd
345		nd
345		nd
345	糸挟み	12725.26
345	糸挟み	107.73
345	糸挟み	5944.98
365		nd
365		nd
365		nd
365	糸挟み	nd
365	糸挟み	21.74
365	糸挟み	11.73
385		nd
385		nd
385		nd
385	糸挟み	0.63
385	糸挟み	<0.1
385	糸挟み	0.17

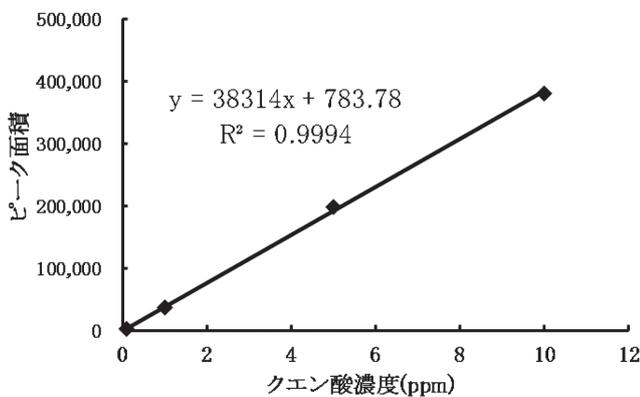


図4 検量線

3. 高圧処理品の測定

本法では、高圧処理後のPETボトル試料をクエン酸が入ったパウチから取り出し、乾燥後、ボトル底部に穴を開け、ピペット等を用いて測定用試料を採取している。これは重要な操作で、キャップを開けてボトル中の水を取り出すと、蓋周辺に付着したクエン酸が測定試料に混入したり、ピペット等を使わずに、ボトルから直接、試料ビンに移すと、ボトル表面に付着したクエン酸が測定試料に混入することから試料溶液とボトル外面が接触しないように十分に注意して採取すべきである。

250 mL容量のPETボトルにイオン交換水を充填し、キャッピング時の巻き締め角度を345°、365°、385°の3通りで行い、更に密封不良モデルとして木綿糸をキャップに噛み込ませたボトル試料を、クエン酸を含むパウチに充填後、高圧処理した。それらのボトル中の水をLC/MS測定した結果を表1に示す。今回の巻き締め角度ではクエン酸が検出されず、密封不良品は発生しなかったが、木綿糸の噛み込み試験ではクエン酸が検出され、その場合は巻き締め角度が浅いほど検出量も多い傾向が見られた。このことから本法はキャップの密封性の評価に利用可能であることが分かった。

4. 侵入水量の推定

容器内への侵入水量の推定が製品の変敗リスク評価において重要である。レトルト殺菌等の加熱殺菌では殺菌後に冷却水が用いられる。冷却水を塩素殺菌しなかった場合、細菌が少なくとも100個/mLを含むと考えると、10 μLあたり1個の細菌がいることになる²⁾。その場合、容器への侵入水量は10 μL未満にするための容器密封性が要求される。

高圧処理では媒体として水を用いており、レトルト殺菌時の冷却水と同様の考えで侵入水量を推定し、変敗リスクを評価できる。本法ではクエン酸量を定量していることから、測定濃度値から、侵入水量を推定できる。例えば、検出液として20 w/v%クエン酸水溶液を使用し、容器の充填水量を250 mLに設定し、測定の結果1 ppm (mg/

L) のクエン酸が検出された場合, 侵入水量は次のような計算となる. $20 \text{ w/v}\% = 20 \text{ g}/100\text{mL} = 200000 \text{ mg}/\text{L}$ のクエン酸が $1 \text{ mg}/\text{L}$ に希釈されたと考えると, その倍率は 200,000 倍となることから, 充填水量 250 mL が 200,000 倍希釈され, $0.00125 \text{ mL} = 1.25 \mu\text{L}$ が侵入水量となる. すなわち, 充填水量を $A \text{ mL}$, クエン酸水溶液の濃度を $B \text{ w/v}\%$, クエン酸測定結果を $C \text{ ppm}$ とすると次の計算式により侵入水量 (μL) を算出できる.

$$\text{侵入水量} (\mu\text{L}) = \{C \div (B \times 10000)\} \times (A \times 1000)$$

なお, $20 \text{ w/v}\%$ のクエン酸水溶液の調製には注意が必要である. 通常 20 g のクエン酸を 100 mL の水に溶かすと, 水かさが増し, 110 mL 以上となる. それを避けるためには必要重量のクエン酸を水で高濃度に溶かした上で, 一定容量に達するまで水を加える操作を行わないと, 容量誤差が大きくなることを認識しておく必要がある. ただし, 計算で補正することも可能である. 我々が行った溶解試験では, 10 g のクエン酸を 50 mL に溶かすと, 水かさが増し, 55.85 mL となった. 従って, クエン酸濃度は $17.9 \text{ w/v}\%$ と補正できる.

まとめ

超高压処理した容器詰め飲料の密封性 (マイクロイミグレーション) を確認するために迅速 LC/MS 吸い込み検知法を考案した.

原理は, 純水を充填した容器を, 水溶性有機物 (例えばクエン酸) を含む水の入ったパウチに詰め, 高压処理後にボトル中の水を LC/MS で測定することにより, 外部の水が容器に入ったかで密封性を検査するものである.

純水の入った PET ボトルを調製し, 高压処理後, 測定した結果, 故意に密封不良させた試料から, 確実に有機物の汚染を確認でき, 本法は密封性評価への利用が示唆された. さらにその定量値から, 混入水量を推定できることから, リスク評価への応用にも期待できる.

本法は容器をクエン酸溶液の入ったパウチに詰めれば, 高压処理だけでなく, 一般的な加熱殺菌等での密封性評価にも利用できると思われる. また基本的にはビン詰め, パウチ詰め, 缶詰など, 容器形態にとらわれないため, ビン詰めのキャップの密封性, パウチのヒートシール部の接着不良評価等, 利用範囲を広く展開できると期待している.

文献

- 1) 日本化学会, 有機化合物の水に対する溶解度, 「化学便覧基礎編」, 改訂 2 版 (丸善, 東京), pp811-818 (1975).
- 2) フード・プロセサーズ・インスティテュート著, 日本缶詰協会研究所訳, 「缶・びん詰, レトルト食品管理技術者のための缶詰食品」, 第 5 版 (日本缶詰びん詰レトルト食品協会, 東京). pp62 (1991).