

# Agilent 8890 GC システムと Agilent 5977B GC/MSD による 乳児用調製粉乳中の 2-MCPD および 3-MCPD 脂肪酸エステル の測定

## 著者

Youjuan Zhang, Xia Yang, and  
Shuai Wang  
Agilent Technologies  
(Shanghai) Co. Ltd. Shanghai  
200131 P. R. China

## 概要

本アプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の 3-モノクロロプロパン-1,2-ジオール (3-MCPD) および 2-モノクロロプロパン-1,3-ジオール (2-MCPD) の脂肪酸エステルを測定することを目的とした信頼性の高い分析メソッドについて説明します。2 つの異なる誘導体化試薬、ヘプタフルオロブチリルイミダゾール (HFBI) とフェニルボロン酸 (PBA) を、サンプル前処理のために評価しました。定性分析および定量分析には、Agilent 8890 GC システムを Agilent 5977B GC/MSD と組み合わせて使用しました。その結果、乳児用調製粉乳中のモノクロロプロパンジオールの分析に対するワークフローソリューションの利点が示されました。優れたピーク形状と分解能が得られました。回収率は 86.9 ~ 106.7 % の範囲であり、十分な値を達成しました。精度も優れており、相対標準偏差は 15 % 未満でした。

## はじめに

モノクロロプロパンジオール (MCPD) は一般的に、食用油脂中のものでモニタリングされています。MCPD は、食品加工中に生成される食品汚染物質です。研究によると、食品に含まれる MCPD の多くは、クロロプロパンジオール脂肪酸エステル (MCPDE) の形で存在します。消化中に、遊離型の MCPD がそのエステル化された形から放出されます。2-および 3-MCPD とそれらのエステルの化学構造を図 1 に示します。

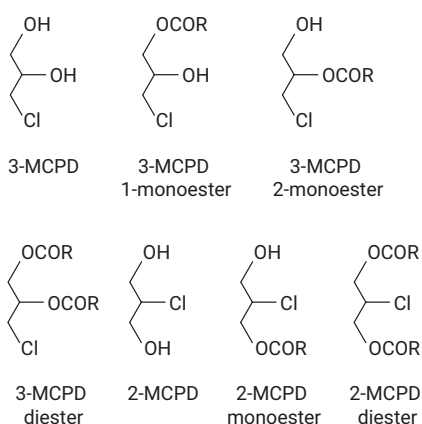


図 1. 2- および 3-MCPD とそのエステルの化学構造

MCPDE を測定するための分析メソッドには、一般に 2 つの異なる手法があります。直接測定と間接測定です。LC/MS による MCPDE の直接測定では、分子構造は破壊されません。MCPDE は多様であり、マトリックスが異なると MCPDE も異なるため、LC/MS の直接測定による定量分析では、それぞれ対応する標準と内部標準が必要となります。MCPDE の間接測定では、MCPD がエステル化された形から開裂されるため、必要な標準が少なくなります。食品中の MCPDE の間接測定には、次のような分析方法が標準化されています。AOCS 2013a<sup>1</sup>、AOCS 2013b<sup>2</sup>、AOCS 2013c<sup>3</sup>、ISO 18363-1<sup>4</sup>、ISO 18363-2<sup>5</sup>、ISO 18363-3<sup>6</sup>、GB 5009.191-2016<sup>7</sup>、SN/T 5220-2019<sup>8</sup>。これらの間接法はすべて、MCPD の開裂、サンプルクリーンアップ、

誘導体化、GC/MS 分析といった類似したプロトコルに従います。難しいステップは、エステル化された形からの MCPD の開裂 (エステル交換) と誘導体化反応です。MCPD の開裂は酸性またはアルカリ性の条件下で行われ、脂肪酸メチルエステルと MCPD を生成します。MCPD は揮発性が低く極性が高いため、GC/MS 分析の前にサンプルを誘導体化する必要があります。間接法は、難しい点がありサンプル前処理が複雑であるにもかかわらず、直接法よりも一般的です。標準にかかるコストが低く、メソッドの多様性があるため、間接測定がより望ましい方法です。

MCPDE は、さまざまな種類の加工食品に含まれている可能性があります。油中の MCPD 分析については多くの研究が報告されています<sup>9</sup>。しかし、ミルクマトリックスでの分析はあまり報告されていません。このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の 2-MCPD および 3-MCPD 脂肪酸エステルを 1 回の分析で同時に測定する手順を示します。このメソッドは、GC/MS 分析の前に、酸触媒によるエステル開裂と、開裂した (遊離) 分析対象物の HFBI または PBA による誘導体化に基づいたものです。サンプル前処理と GC/MS 条件をとともに最適化し、分析メソッドの性能を評価しました。

## 実験方法

### 材料および試薬

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。水は、精製システムを使用して得られた超純水を使用しました。*n*-ヘキサン、テトラヒドロフラン (THF)、ヘプタン、硫酸 (純度 ≥95 %)、メタノール、アセトン、ヘプタフルオロブチリルイミダゾール (HFBI、純度 ≥99 %)、*rac* 1,2-*bis*-パルミトイル-3-クロロプロパンジオール (純度 ≥98 %)、*rac* 1,2-*bis*-パルミトイル-3-クロロプロパンジオール-*d*<sub>5</sub> (純度 ≥99 %)、1,3-ジステアロイル-2-クロロプロパンジオール (純度 ≥98 %)、1,3-ジステアロイル-2-クロロプロパンジオール-*d*<sub>5</sub> (純度 ≥98 %) およびフェニ

ルボロン酸 (PBA、純度 ≥98 %) は ANPEL Laboratory Technologies (上海) Inc. から購入しました。炭酸水素ナトリウム (純度 ≥99.5 %) は J & K Scientific Ltd. から購入しました。硫酸ナトリウム (純度 ≥99 %) は Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd. から購入しました。

### 溶液および標準試料

- MCPD エステルの原液は、溶媒として *n*-ヘキサンを使用して調製しました。
- 硫酸/メタノール溶液 (1.8 %、体積分率) は、100 mL のメスフラスコに硫酸 1.8 mL をピペットで入れ、メタノールで定容化して調製しました。
- 炭酸水素ナトリウム溶液 (9.6 %、質量濃度) は、炭酸水素ナトリウム 9.6 g を 100 mL のメスフラスコに量り取り、超純水で定容化して調製しました。超音波洗浄器を使用して、試薬を完全に溶解させました。
- フェニルボロン酸溶液 (PBA 溶液) は、フェニルボロン酸 2.5 g を秤量し、アセトン/超純水混合物 (19/1、体積分率) 20 mL を加えることによって調製しました。次に、この混合物を激しく振とうしました。
- 硫酸ナトリウム溶液 (20 %、質量濃度) は、硫酸ナトリウム 20 g を 100 mL のメスフラスコに量り取り、超純水で定容化して調製しました。超音波洗浄器を使用して、試薬を完全に溶解させました。

## サンプルおよび標準溶液の前処理

乳児用調製粉乳サンプルは、地元の食料品店から購入しました。サンプル前処理の全体ワークフローを図 2 に示します。サンプル前処理プロセスは、4 つの主要な部分に分けられます。サンプル抽出、酸エステル交換、サンプルクリーンアップ、および HFBI または PBA による開裂（遊離）成分の誘導体化です。最初の 2 つのステップ、すなわちサンプル抽出と酸エステル交換はすべてのサンプルで同じです。最後の 2 つのステップであるクリーンアップと誘導体化は、使用する誘導体化試薬によって異なります。サンプル前処理法の 2 つのプロ

セスは、ユーザーの都合やラボの状況に応じていずれかを選択できます。

マトリックスブランクは、サンプル前処理手順全体を通して、クリーンな乳児用調製粉乳サンプルを採取することによって作成しました。マトリックス適合キャリブレーション標準は、サンプル抽出後、酸エステル交換前に標準溶液をマトリックスにスパイクすることによって作成しました。標準溶液は、10、20、50、100、200、500、および 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （遊離体換算）に対応します。本研究で言及されている濃度レベルは、すべて MCPD 遊離体換算です。Rac 1,2-bis-パルミトイル-3-クロロ

プロパンジオール- $d_5$  および 1,3-ジステアロイル-2-クロロプロパンジオール- $d_5$  を、それぞれ 3-MCPD および 2-MCPD エステルの内部標準として使用しました。内部標準は 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の濃度で調製しました。プレスパイク品質管理 (QC) サンプルは、適切な希釈標準溶液を乳児用調製粉乳にスパイクし、1 分間ボルテックスした後、サンプル抽出プロセスが平衡に達するまで 5 分間静置することによって作成しました。QC サンプルは、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のレベルの検量線に対して定量し、5 回繰り返し分析しました。

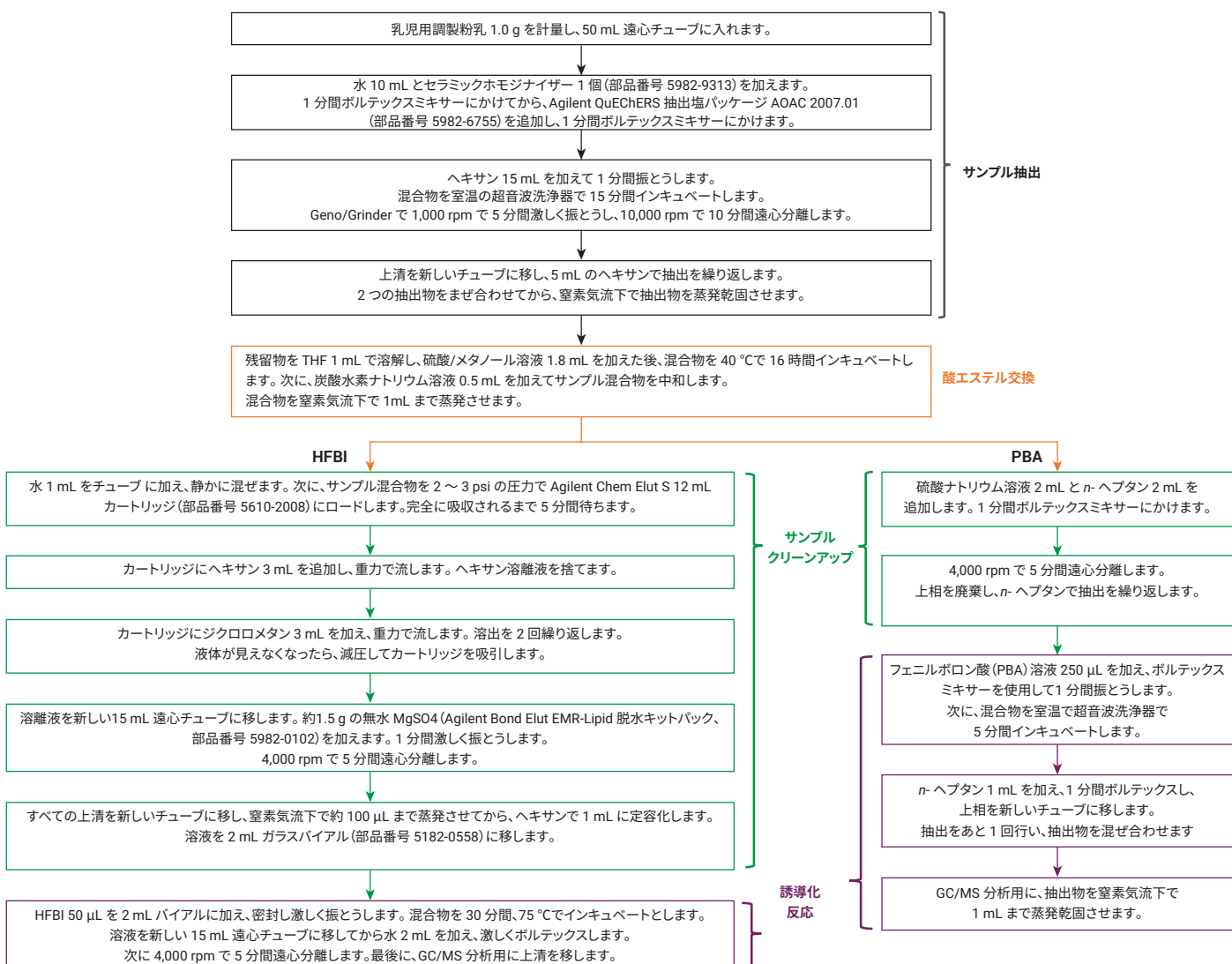


図 2. 誘導体化試薬として HFBI または PBA を使用したサンプル前処理法の段階的な手順

## 実験器具と材料

サンプル前処理用に使用した機器および材料は次のとおりです。

- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Eppendorf Centrifuge 5810R (ハンブルグ、ドイツ)
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド (部品番号 12234101)
- Agilent QuEChERS 抽出塩パッケージ、AOAC 2007.01 メソッド (部品番号 5982-6755)
- Agilent Bond Elut EMR-Lipid 脱水キットパック、3.5 g 無水 MgSO<sub>4</sub> (部品番号 5982-0102)
- Agilent セラミックホモジナイザ 50 mL 用 (部品番号 5982-9313)
- Agilent Chem Elut S、3 mL サンプル、12 mL チューブ (部品番号 5610-2008)

## 分析条件

分析は、Agilent 5977B GC/MSD を備えた Agilent 8890 GC システムで実施しました。機器の設定条件を表 1 に示します。

表 1. MCPD 分析の条件

パラメータ	設定値
注入量	1 µL
注入口	スプリット/スプリットレス、温度：280 °C、スプリットレスモード、パージフロー 60 mL/min (0.75 分で)
注入口ライナ	Agilent ウルトライナート、スプリットレス、シングルテーパー、ガラスウール入り (部品番号 5190-2293)
カラム	Agilent J & W DB-5ms ウルトライナート GC カラム、30 m × 0.25 mm × 1 µm (部品番号 122-5533UI)
キャリアガス	ヘリウム、1 mL/min の定流量
オープンプログラム	<b>HFBI 誘導化試薬</b> 50 °C (1 分間)、20 °C/min で 90 °C まで、2 °C/min で 100 °C まで (4 分間)、30 °C/min で 300 °C まで ポストラン温度：310 °C、 ポストラン流量：3 mL/min、 ポストラン時間：5 分間 <b>PBA 誘導化試薬</b> 50 °C (1 分間)、25 °C/min で 180 °C まで (2 分間)、2 °C/min で 190 °C (2 分間)、30 °C/min で 230 °C まで (10 分間) ポストラン温度：310 °C、 ポストラン流量：3 mL/min、 ポストラン時間：5 分
トランスファーライン温度	280 °C
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
取り込みモード	SIM
EM 電圧ゲインモード	2
溶媒ディレイ	5 分
チューニングファイル	Etune.u

## 結果と考察

### クロマトグラム

本研究は、スプリット/スプリットレス注入口付きの 8890 GC システムおよび電子イオン化 (EI) イオン源付き Agilent 5977B GC/MSD を用いて実施しました。選択イオンモニタリング (SIM) モードで MSD データを採取し、Agilent MassHunter ソフトウェアで解析しました。2- および 3- MCPD の定量は、それぞれ 2- および 3-MCPD-d5 強度比に基づいています。図 3 および 4 に、HFBI 誘導体化による 200 µg/kg のスパイクレベルにおける乳児用調製粉乳中のターゲット化合物の抽出イオンクロマトグラム (EIC) トレースを示します。システムは良好な分解能を示しています。内部標準を含むターゲット化合物は、ベースライン分離されています。図 5 は、PBA 誘導体化による 200 µg/kg のスパイクレベルでの EIC トレースを示しています。PBA を使用し

た場合、内部標準とターゲット化合物は HFBI と比較して十分に分離されていません。共溶出する化合物は共通の MSD フラグメントを有さないため、各化合物に固有のイオンを抽出して個別に解析できます。クロマトグラムのターゲット化合物の前後に数多くのノンターゲットピークが溶出しているのが見られることがあります。これはサンプルの前処理の多段階反応によって引き起こされたものです。MassHunter ソフトウェアのポストラン機能を、より高いオープン温度とカラム流量で使用しました。このポストラン機能により、分析時間を短縮し、サンプルスループットを向上させ、MSD の汚染を減らすことができます。ポストカラムのバックフラッシュデバイスはこの実験では使用しませんでした。カラムと MSD の汚染を効果的に保護および低減するため、その使用を推奨します。

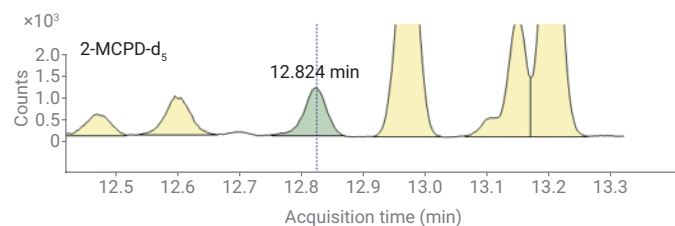
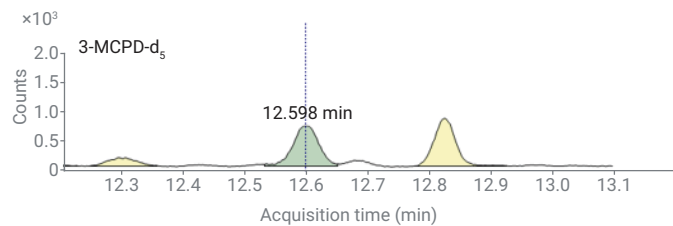
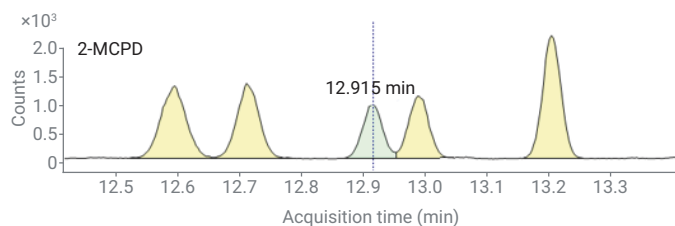
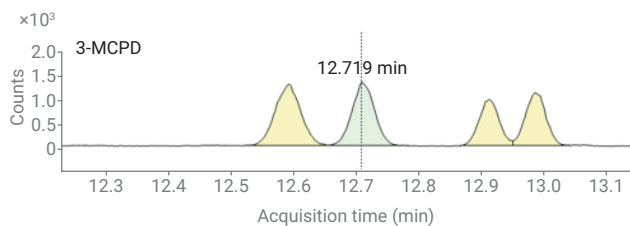


図 3. 乳児用調製粉乳中のスパイクレベル 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で HFBI 誘導体化を行ったターゲット化合物の GC/MSD EIC トレース

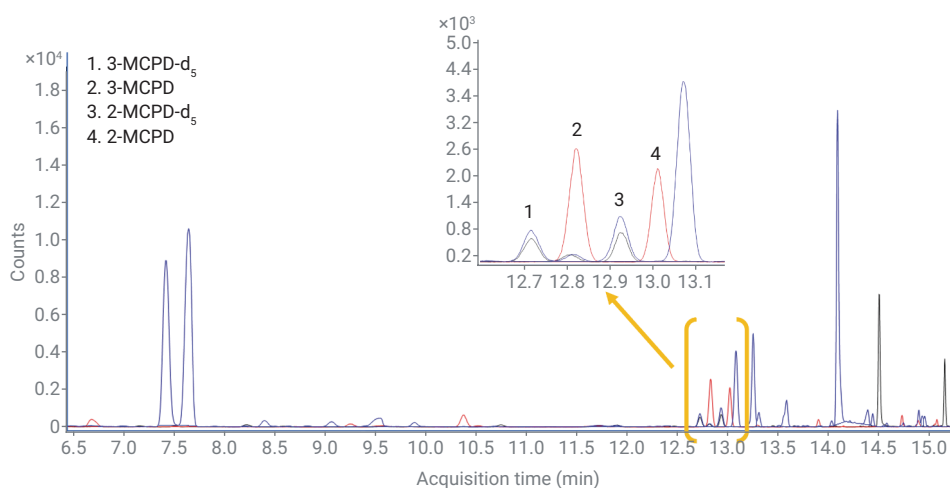


図 4. 乳児用調製粉乳中のスパイクレベル 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  における HFBI 誘導体の GC/MSD EIC トレース

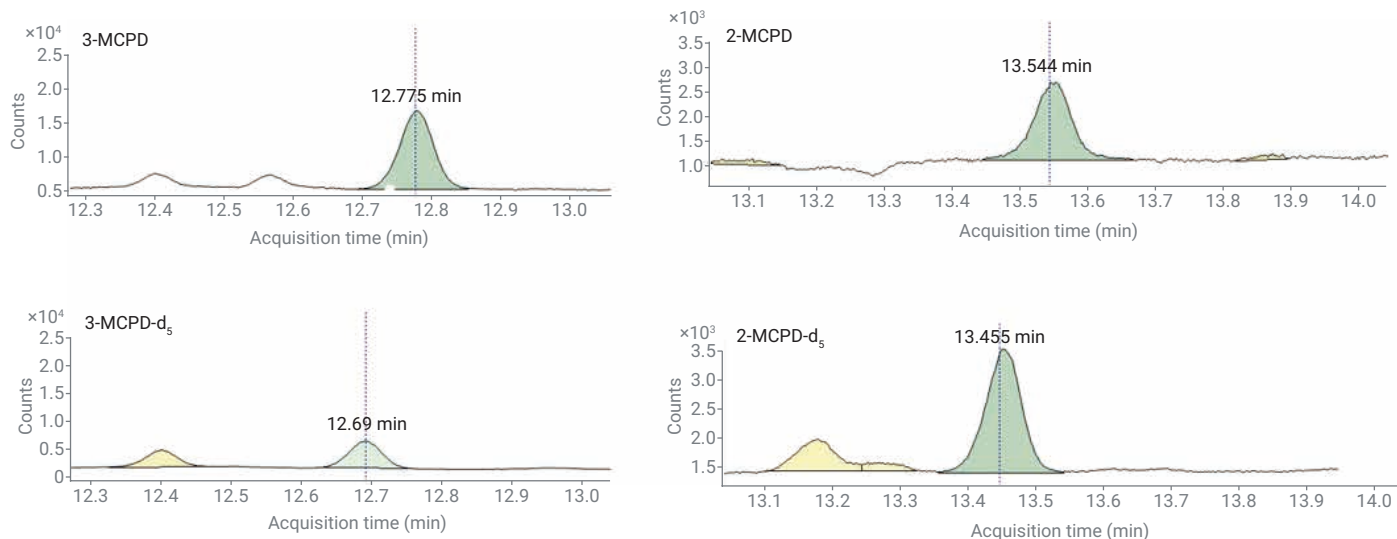


図 5.スパイクレベル 200 µg/kg で PBA 誘導体化を行ったターゲット化合物の GC/MSD EIC トレース

## メソッドの最適化

**カラムの評価：**最適なキャピラリー GC カラムを選択するうえでは、固定相と寸法が最も重要な要素です。メソッド GB 5009.191-2016 および SN/T5220-2019 では、30 m×0.25 mm、0.25 µm の寸法の低極性カラムが推奨されています。しかし、誘導体化試薬として HFBI を使用した場合、Agilent J & W HP-5ms Ultra Inert、30 m×0.25 mm、0.25 µm カラムでは、3-MCPD と 2-MCPD をベースライン分離できず、3-MCPD と 2-MCPD は高感度の定量イオン  $m/z$  289 を共有しました。本研究では、フィルムの厚いカラム、Agilent J & W DB-5ms Ultra Inert、30 m×0.25 mm、1 µm カラムを使用して分離度を向上させました。

**塩パッケージの評価：**サンプル抽出プロセスでは、水 10 mL とセラミックホモジナイザ 1 個を 1 g の乳児用調製粉乳に加えた後、ヘキサン 15 mL を加えて抽出しました。ヘキサン抽出中に乳化が起きました。しかし、サンプルに塩を添加すると、水相と有機相が明確に

分離するのが観察されました。塩を添加すると水相のイオン強度が増し、その結果脂質が有機相に分布しやすくなり乳化を効果的に減らします。本研究では、QuEChERS 抽出塩パッケージ (AOAC 2007.01 メソッド) を使用しました。これにより、分離層が明確になり、抽出効率が安定し、優れた回収率が実現できました。

**HFBI 誘導体化によるクリーンアップの評価：**サンプルのクリーンアップにはさまざまなプロセスが利用できます。Agilent Chem Elut S 12 mL 保持型液液抽出 (SLE) カートリッジと従来の液液抽出 (LLE) を比較しました。Chem Elut S を使用した操作ステップの詳細を図 2 に示します。LLE は、溶出溶媒としてジクロロメタンを使用して遠心分離チューブ内で実施しました。抽出効率を高めるために、ボルテックスミキサーを使用してサンプルを十分に混合しました。遠心分離後、ジクロロメタンが下層にとどまり回収可能となりました。上部の水層を新しいチューブに移して抽出を

繰り返しましたが、この操作には特に注意が必要です。ターゲット化合物を効率的に抽出するためにこのプロセスを 3 回実施しました。ジクロロメタン層は混ぜ合わせて 1 つにしました。2 つのクリーンアッププロセスからの応答結果は類似していましたが、LLE の方がより時間と労力を要しました。LLE と比較して SLE は、自動で実行できる抽出ワークフローとなっており、特別な注意を払う必要はありません。SLE メソッドを用いると手間が減ってサンプルの抽出が容易になり、生産性とスループットが大幅に向上しました。このように、本研究では SLE を使用したシンプルなワークフローを提供しました。

**HFBI 誘導体化による溶媒の評価：**誘導体化前のクリーンアッププロセス中の溶出溶媒として、ジクロロメタンを使用しました。ヘキサンとジクロロメタンの2種類の溶媒を、誘導体化反応および、MCPD 誘導体の最終サンプル溶媒として使用するために調査しました。図6に示すように、3-MCPD と 2-MCPD の両方のサンプル溶媒としてヘキサンを使用すると、より高い応答が得られました。すなわち感度が向上しました。したがって、SLE サンプルのクリーンアップと水分除去の後、回収した溶離液（ジクロロメタン）を窒素気流下で約100  $\mu$ L まで蒸発させました。次に誘導体化反応の前に、サンプルをヘキサンで再溶解し 1 mL としました。

### メソッドバリデーション

MCPD 化合物は極性が高く、沸点が高いため、ピーク形状の問題が発生する可能性があります。ピーク形状と感度を向上させるために、MCPD 化合物は通常、GC 分析の前に誘導体化されます。最適な誘導体化試薬の選択は、メソッドの成功にとって極めて重要です。反応速度、操作の容易さ、干渉する可能性のある副生成物の生成、および選択性などすべての要素を考慮する必要があります。GB5009.191-2016 メソッドでは誘導体化試薬として HFBI が推奨されていますが、ISO 18363-3、AOCS Cd 29a、および SN/

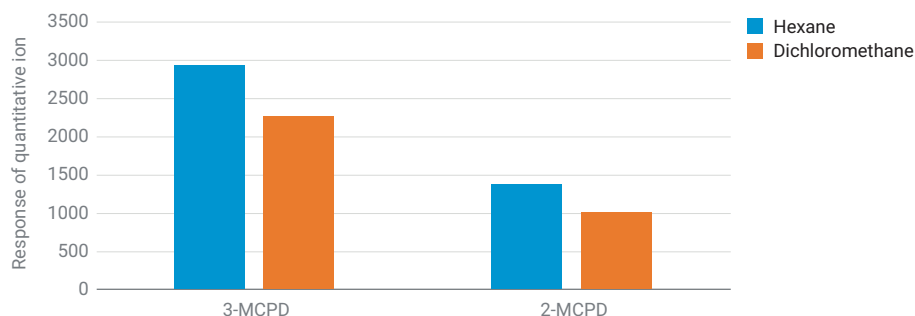


図6. HFBI 誘導体化におけるさまざまなサンプル溶媒の比較

T5220-2019 メソッドでは PBA が使用されます。HFBI メソッドでは誘導体化試薬が水に敏感で、水の存在下では誘導体化反応は失敗します。したがって、HFBI 誘導体化の前に水を完全に除去することが極めて重要なステップとなります。また、吸湿による不具合を防ぐために、HFBI の保管にも注意を払わなければなりません。PBA メソッドと比較した場合の HFBI メソッドの利点は、PBA がジオールとのみ反応して非極性環状生成物を形成するのに対し、HFBI はすべての求核性分子と反応する可能性があることです。そのため、2-MCPD および 3-MCPD の測定では、誘導体化試薬として PBA がよく選択されます。ただし、HFBI は、MCPD およびジクロロプロパノールの同時測定に適しています。質量分析を検出に使

用する場合、低分子量化合物との干渉を回避するために、HFBI 誘導体に高質量のフラグメントイオンを選択できます。PBA メソッドの利点は、HFBI メソッドよりも簡単で時間がかからないことです。PBA の場合、誘導体化反応は水の存在下でも進み、必要な反応時間は短くなります。本研究では HFBI と PBA の両方を評価し、両方で満足いく性能が得られています。



**HFBI メソッド**：本研究では、HFBI 誘導体化による定量メソッドの評価として、直線性・再現性・検出下限・および回収率をテストしました。10 ~ 1,000 µg/kg の濃度レベルで調製されたマトリックス適合キャリブレーション標準を用いて、2 つの成分に対して相関係数値 ( $R^2$ )  $\geq 0.997$  が得られました。検量線を図 7 に示します。再現性の測定 (濃度 %RSD) は、10、100、および 1,000 µg/kg のスパイクサンプルを 8 回注入して評価しました。表 2 に、0.5 ~ 3.1 % の範囲の濃度 RSD を示します。優れた性能であることがわかります。10 µg/kg の低濃度レベルのマトリックス適合キャリブレーション標準を 8 回の繰り返し注入をして分析し、検出下限を計算しました。3-MCPD および 2-MCPD の検出下限は、それぞれ 1.35 および 1.30 µg/kg でした。回収率と精度は、200 µg/kg のスパイクレベルで 5 回の繰り返しで測定しました。表 3 に示すように、平均回収率は、3-MCPD で 86.9 %、2-MCPD で 106.7 % であり、RSD は 15 % 未満でした。

**PBA メソッド**：PBA メソッドでは、メソッド検証用の QC サンプルとして同じスパイクレベル 200 µg/kg を分析しました。詳細な定量結果を表 3 に示します。2 つの成分で 80 ~ 120 % の回収率が達成され、RSD は 10 % 未満であり、許容できる結果でした。

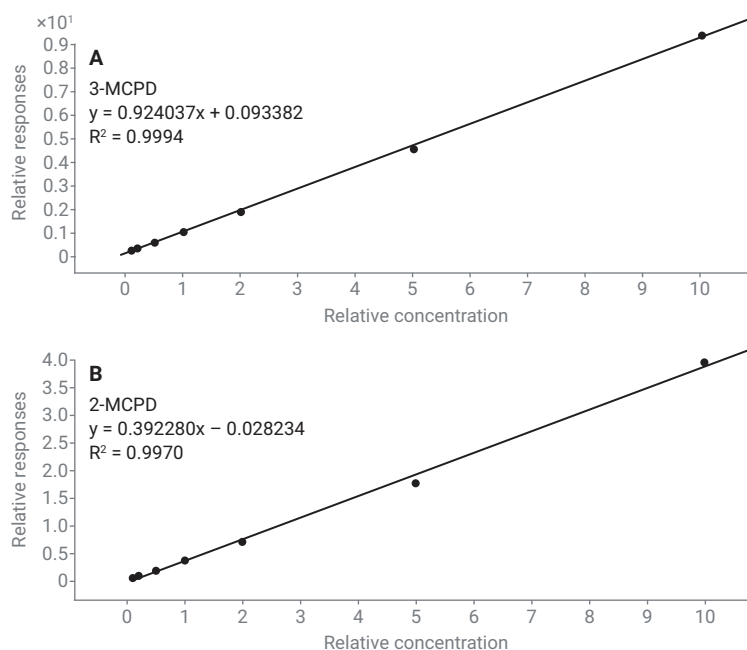


図 7. 10 ~ 1,000 µg/kg の検量線。A) 3-MCPD HFBI 誘導体、B) 2-MCPD HFBI 誘導体

表 2. HFBI 誘導体のメソッド定量結果

化合物名	リテンションタイム (分)	濃度 %RSD (n = 8)			検出下限 (µg/kg)
		10 µg/kg	100 µg/kg	1,000 µg/kg	
3-MCPD	12.820	3.1	1.3	0.5	1.35
2-MCPD	13.012	2.1	1.6	1.3	1.30

表 3. 200 µg/kg の QC サンプルの回収率と精度の結果 (n = 5)

化合物名	HFBI			PBA		
	定量イオン	平均回収率 %	% RSD	定量イオン	平均回収率 %	% RSD
3-MCPD	289	86.9	14.3	147	103.4	9.2
2-MCPD	289	106.7	5.8	198	100.9	4.2



## 結論

本アプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の 2-MCPD および 3-MCPD 脂肪酸エステルを同時に測定する方法を示しました。サンプル前処理に異なる誘導体化試薬を使用し、信頼性が高く堅牢な 2 つのワークフローを開発しました。データの取得と分析には、Agilent 5977B GC/MSD を備えた Agilent 8890 GC システムを使用しました。HFBI 誘導体に対して、直線性・検出下限・回収率・および精度に関してメソッドを検証しました。PBA 誘導体についても、回収率と精度の結果を評価しました。2 つのサンプル前処理プロセスから得られた結果は満足のいくもので、乳児用調製粉乳中の MCPD エステル分析のリファレンスとして役立ちます。

## 参考文献

1. 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification. *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**.
2. Determination of Bound Monochloropropanediol-(MCPD-) and Bound 2,3-Epoxy-1-Propanol (Glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (2013). *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**.
3. Fatty-Acid-Bound 3-Chloropropane-1,2-Diol (3-MCPD) and 2,3-Epoxy-Propane-1-ol (Glycidol), Determination In Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement). *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**.
4. Animal and Vegetable Fats and Oils—Determination of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 1: Method Using Fast Alkaline Transesterification and Measurement for 3-MCPD and Differential Measurement for Glycidol. *International Organization for Standardization* **2015**, ISO 18363-1:2015.
5. Animal and Vegetable Fats and oils—Determination of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 2: Method Using Slow Alkaline Transesterification and Measurement for 2-MCPD, 3-MCPD, and Glycidol. *International Organization for Standardization* **2018**, ISO 18363-2:2018.
6. Animal and Vegetable Fats and Oils—Determination Of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 3: Method Using Acid Transesterification and Measurement for 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol. *International Organization for Standardization* **2017**, ISO 18363-3:2017.
7. Determination of Chloropropanol And its Fatty Acid Esters in Food. *National Food Safety Standard* **2016**, GB 5009.191-2016.
8. Determination of 3-Chloropropanol Esters (3-MCPDE) and Glycidol Esters GE in Food Products for Export—Gas Chromatography Mass Spectrometry Method. **2019**, SN/T 5220-2019.
9. Arisseto, A.; Marcolino, P. Determination of 3-MCPD Diesters and Monoesters in Vegetable Oils and Fats. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-3406EN, **2013**.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
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. 2021  
Printed in Japan, April 16, 2021  
5994-3233JAJP  
DE44301.716712963

