

乳児用調製粉乳中の3-MCPD, 2-MCPD, 3-MCPD脂肪酸エステル類、2-MCPD脂肪酸エステル類及びグリシドール脂肪酸エステル類の分析標準作業手順書

1. 適用

この分析法は、乳児用調製粉乳中の3-クロロ-1, 2-プロパンジオール（3-MCPD）、2-クロロ-1, 3-プロパンジオール（2-MCPD）、3-MCPD脂肪酸エステル類、2-MCPD脂肪酸エステル類及びグリシドール脂肪酸エステル類の定量に適用する。

2. 分析法の原理及び概要

試料からメタノール及び ϵ -ブチルメチルエーテルで分析対象物質を抽出し、水相と有機相を分離する。水相に含まれる3-MCPD及び2-MCPDについては、フェニルホウ酸（PBA）で誘導体化し、有機相に含まれる3-MCPD脂肪酸エステル類、2-MCPD脂肪酸エステル類及びグリシドール脂肪酸エステル類については、水酸化ナトリウムで遊離化した後、グリシドールを3-ブromo-1, 2-プロパンジオール（3-MBPD）に臭素化し、PBAで誘導体化して、それらをガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で定量する。

3. 容器、器具、機器

電子天秤：最小表示が0.01 g以下のもの及び0.01 mg以下のもの

ボルテックスミキサー

ホモジナイザー

超音波槽：水槽を65℃に加温できるもの

遠心分離機

インキュベーター：-25℃に冷却できるもの

エバポレーター

ヒートブロック：40℃及び70℃に加温し、窒素を吹き付けて溶媒を除去できるもの

スパチュラ

15 mL容ねじ口試験管

10 mL容ねじ口試験管

試験管用ラック

パスツールピペット
マイクロシリンジ
全量フラスコ
サンプルバイアル
GC-MSシステム

4. 試薬

グリシドールオレイン酸エステル（純度98%以上）
d5-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールジオレイン酸エステル（純度98%以上）¹
d5-2-クロロ-1, 3-プロパンジオールジパルミチン酸エステル（純度98%以上）²
d5-グリシドールオレイン酸エステル（純度98%以上）³
d5-3-MCPD（純度98%以上）⁴
d5-2-MCPD（純度98%以上）⁵
フェニルホウ酸
無水硫酸ナトリウム
臭化ナトリウム
超純水
水酸化ナトリウム
メタノール
りん酸
ジエチルエーテル
t-ブチルメチルエーテル
イソヘキサン

¹ この SOP の作成に当たり使用したサロゲートのラベル化体の割合は、仕様書によると>97%であった。

² この SOP の作成に当たり使用したサロゲートのラベル化体の割合は、仕様書によると
d0 : 0.05%、d1 : 0.00%、d2 : 0.06%、d3 : 0.51%、d4 : 15.62%、d5 : 83.76%であった。

³ この SOP の作成に当たり使用したサロゲートのラベル化体の割合は、仕様書によると 98.79%であった。

⁴ この SOP の作成に当たり使用したサロゲートのラベル化体の割合は、仕様書によると 98.3%であった。

⁵ この SOP の作成に当たり使用したサロゲートのラベル化体の割合は、仕様書によると
d0 : 0.00%、d1 : 0.00%、d2 : 0.61%、d3 : 0.57%、d4 : 8.59%、d5 : 90.23%であった。

イソオクタン

フリーズドライミルク：あらかじめ対象物質が含まれないことを確認したもの

オリーブオイル：あらかじめ対象物質が含まれないことを確認したもの

5. 試薬及び標準溶液の調製

5. 1 試薬の調製

- a) 0.6%(w/v)水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム0.6 gをメタノール100 mLに溶解する。-25℃±3℃に冷却して使用する。
- b) 6.5 mL/Lりん酸含有600 g/L臭化ナトリウム溶液：臭化ナトリウム180 g にりん酸1.95 mLを加え、水で300 mLに定容する。 -25℃±3℃に冷却して使用する。
- c) 飽和硫酸ナトリウム溶液：無水硫酸ナトリウム140 gに水500 mLを加え、50℃で加温溶解後、室温で静置し、結晶が析出後の上澄みを使用する。
- d) 5 mg/mLフェニルホウ酸溶液：フェニルホウ酸をジエチルエーテルに溶解し、約5 mg/mLとする。
- e) メタノール・*t*-ブチルメチルエーテル混合液（1:1v/v）：メタノールと*t*-ブチルメチルエーテルを1：1（v/v）の割合で混合する。
- f) イソヘキサン・*t*-ブチルメチルエーテル混合液（4:1v/v）：イソヘキサンと*t*-ブチルメチルエーテルを4：1（v/v）の割合で混合する。
- g) ジエチルエーテル・酢酸エチル混合液（9:1v/v）：ジエチルエーテルと酢酸エチルを9：1（v/v）の割合で混合する。

5. 2 標準溶液の調製

5. 2. 1 保存用標準用液の調製

- a)～f)のとおり保存用標準溶液を調製する。エステル体及び内標準物質の標準溶液は、次式により3-MCPD、2-MCPDまたはグリシドール当量の濃度を算出する。

$$C(\text{当量}) = C(\text{標準物質}) \times \frac{MW(\text{当量})}{MW(\text{標準物質})} \times r$$

C（当量）：3-MCPD、2-MCPDまたはグリシドール当量の濃度

C（標準物質）：標準物質の濃度

MW（当量）：3-MCPD、2-MCPDまたはグリシドールの分子量

MW（標準物質）：標準物質の分子量

r：標準試薬の純度やラベル体の割合

- a) グリシドールオレイン酸エステル溶液（グリシドール当量25 µg/mL）：グリシドールオレイン酸エステル11.42 mgを100 mL全量フラスコに量り取り、トルエンで定容する。
- b) d5-3-MCPDジオレイン酸エステル溶液（3-MCPD当量25 µg/mL）：d5-3-MCPDジオレイン酸エステル14.58 mgを100 mL全量フラスコに量り取り、トルエンで定容する。
- c) d5-2-MCPDジパルミチン酸エステル溶液（2-MCPD当量25 µg/mL）：d5-2-MCPDジパルミチン酸エステル13.40 mgを100 mL全量フラスコに量り取り、トルエンで定容する。
- d) d5-グリシドールオレイン酸エステル溶液（グリシドール当量25 µg/mL）：d5-グリシドールオレイン酸エステル11.59 mgを100 mL全量フラスコに量り取り、トルエンで定容する。
- e) d5-3-MCPD溶液（3-MCPD当量10 µg/mL）：d5-3-MCPD10.46 mgを1000 mL全量フラスコに量り取り、メタノールで定容する。
- f) d5-2-MCPD溶液（2-MCPD当量10 µg/mL）：d5-2-MCPD10.46 mgを1000 mL全量フラスコに量り取り、メタノールで定容する。

5. 2. 2 標準溶液の調製

- a) エステル体混合内標準溶液（3-MCPD当量10 µg/mL、2-MCPD当量5 µg/mL、グリシドール当量5 µg/mL）：5. 2. 1 b) 10 mL, c), d) それぞれ5 mLを25 mL全量フラスコに加え、トルエンで定容する。
- b) 10 µg/mL (3-MCPD当量) d5-3-MCPDジオレイン酸エステル標準溶液：5. 2. 1 b) 2 mLを5 mL全量フラスコに加え、トルエンで定容する。
- c) 1.0 µg/mL (グリシドール当量) グリシドールオレイン酸エステル標準溶液：5. 2. 1 a) 1 mLを25 mL全量フラスコに加え、トルエンで定容する。
- d) 1.0 µg/mL遊離体混合内標準溶液：5. 2. 1 e), f) それぞれ5 mLを50 mL全量フラスコに加え、メタノールで定容する。

6. 試験溶液の調製

6. 1 試料からの抽出

- 6. 1. 1 試料2 g (1.99 g～2.01 g) を15 mL容ねじ口試験管に量り取る。
- 6. 1. 2 標準溶液 5. 2. 2 a) 及び 5. 2. 2 d) を各100 µLを加える。

6. 1. 3 1回目の抽出のため、メタノール6 mLを加え、ふたをしてすぐ攪拌する。塊が崩れない場合はスパチュラ又はホモジナイザー等を使用して塊を崩す。
6. 1. 4 超音波槽で、65℃、15分間超音波にかける。
6. 1. 5 遠心分離機で、3,000 rpm⁶、1分間遠心分離する。
6. 1. 6 パスツールピペットを使って、上澄みを新しい15 mL容ねじ口試験管に移す。15 mL容ねじ口試験管をヒートブロックで70℃に加温し、窒素気流下で濃縮する。この操作に併せて、6. 1. 7及び6. 1. 8の2回目及び3回目の抽出を行う。
6. 1. 7 2回目の抽出のため、残った溶液に、メタノール・*t*-ブチルメチルエーテル混合液（1:1v/v）6 mLを加え、6. 1. 3の攪拌～6. 1. 5の操作を繰り返し、上澄みを6. 1. 6の15 mL容ねじ口試験管に合わせる。
6. 1. 8 3回目の抽出のため、残った溶液に、*t*-ブチルメチルエーテル6 mLを加え、6. 1. 3の攪拌～6. 1. 5の操作を繰り返し、上澄みを6. 1. 7の15 mL容ねじ口試験管に合わせる。
6. 1. 9 上澄みを合わせた15 mL容ねじ口試験管をヒートブロックで70℃に加温し、窒素気流下で1 mL～2 mLになるまで濃縮する。
6. 1. 10 飽和硫酸ナトリウム溶液4 mLを添加する。
6. 1. 11 イソヘキサン・*t*-ブチルメチルエーテル混合液（4:1 v/v）2.5 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離し、溶媒層を、パスツールピペットを使って、あらかじめ容器の重さを測定した10 mL容ねじ口試験管に移す（水層には遊離型3-MCPD及び2-MCPDが存在するため境界面はとらないようにする）。
6. 1. 12 6. 1. 11の操作を再度行い、1回目の抽出液と合わせる。溶媒層は6. 2に、水層は6. 3に進む。
6. 2 結合型の分析
6. 2. 1 6. 1. 12の溶媒層を合わせた10 mL容ねじ口試験管をヒートブロックで40℃に加温し、窒素気流下で約500 mgになるまで濃縮する。
6. 2. 2 質量を測定し、500 mg±50 mgに調整する。多い場合は除去し、少ない場合はオリーブオイルを追加する。

⁶ この SOP の作成に当たり使用した遠心分離機では 3,000rpm=2,054 g

6. 2. 3 *t*-ブチルメチルエーテル3 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌する。溶解後、 $-25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ で15分以上冷却する。
6. 2. 4 $-25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ で冷却した0.6%(w/v)水酸化ナトリウム溶液1.4 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌する。インキュベーターで $-25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、15～18時間冷却し、エステル交換反応により遊離型にする。
6. 2. 5 $-25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ で冷却した6.5 mL/Lりん酸含有600 g/L臭化ナトリウム溶液2.4 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌、反応を停止させる。
6. 2. 6 室温、窒素気流下で20分間濃縮しながら、グリシドールを3-MBPDに変換する。
6. 2. 7 イソヘキサン・*t*-ブチルメチルエーテル混合液 (4:1v/v) 2 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離し、パスツールピペットを使って、溶媒層を除去する。本操作を計3回繰り返す。3回目は、水層を新しい10 mLねじ口試験管に移す。このとき、溶媒層が極力含まれないように注意する。
6. 2. 8 残った溶液に、ジエチルエーテル・酢酸エチル混合液 (9:1 v/v) 2 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離する。スパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った10 mL容ねじ口試験管に、パスツールピペットを使って、溶媒層を移す。本操作を計3回繰り返す。
6. 2. 9 6. 2. 8で得られた溶液に、5 mg/mLフェニルホウ酸溶液100 μL を添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌し、誘導体化する。
6. 2. 10 室温、窒素気流下で乾固させ、イソオクタン300 μL を添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離し、上清をサンプルバイアルに移し、GC-MS測定用試料溶液とする。

6. 3 遊離型の分析

6. 3. 1 6. 1. 12で得られた水層にイソヘキサン・*t*-ブチルメチルエーテル混合液 (4:1v/v) 2.5 mLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離し、パスツールピペットを使って、水層を新しい10 mLねじ口試験管に移す。このとき、溶媒層が極力含まれないように注意する。
6. 3. 2 残った溶液に、ジエチルエーテル・酢酸エチル混合液 (9:1v/v) 2 mL

を添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×2回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離する。スパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った10 mL容ねじ口試験管に、パストゥールピペットを使って、溶媒層を移す。本操作を計3回繰り返す。

6. 3. 3 6. 3. 2で得られた溶液に、5 mg/mLフェニルホウ酸溶液100 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌し、誘導体化する。
6. 3. 4 室温、窒素気流下で乾固させ、イソオクタン300 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間×1回攪拌する。遠心分離機で、3,000 rpm、1分間遠心分離し、上清をサンプルバイアルに移し、GC-MS測定用試料溶液とする。

6. 4 Tf値の算出

6. 4. 1 フリーズドライミルク2 g (1.99 g~2.01 g) に、標準溶液5. 2. 2 b)及び5. 2. 2 c)を各100 μ Lを加える。
6. 4. 2 6. 1及び6. 2と同様の操作を行い、GC-MS測定に供する。

7. 測定機器

GC-MS測定条件

- a) 分離カラム : DB-17ms ϕ 0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μ m (Agilent)
- b) 注入方法 : スプリット/スプリットレス注入口、スプリットレス
- c) 温度 : 注入口135°C
カラム85°C (0.5 分保持) →6°C/分 昇温→150°C→12°C/分 昇温→180°C→25°C/分 昇温→280°C (8 分保持)
- d) ガス流量 : ヘリウム1.0 mL/分
- e) パージ流量 : 50 mL/分、1 分
- f) 注入量 : 1 μ L
- g) トランスファライン温度 : 280°C
- h) イオン源温度 : 230°C
- i) イオン化法 : EI
- j) モニターイオン条件 : 下表のとおり

m/z 147 において 3-MCPD の保持時間後に夾雑成分由来の大きいピークが認められるため、3-MCPD、3-MCPD-d5 とそれ以外で m/z の取得グループを分けた方がよい。

表 測定イオン一覧

対象物質名	測定イオン (<i>m/z</i>)	測定時間 (ms)	対象物質名	測定イオン (<i>m/z</i>)	測定時間 (ms)
3-MCPD	196 [※]	30	2-MCPD	196 [※]	30
	147	30		198	30
	198	30	2-MCPD-d5 (IS)	201 [※]	30
	146	30		203	30
3-MCPD-d5 (IS)	201 [※]	30	3-MBPD	240 [※]	30
	150	30		242	30
	203	30	3-MBPD-d5 (IS)	245 [※]	30
	149	30		247	30

※ 定量イオン

8. 定性・定量

8. 1 定性

試料溶液を測定した結果、それぞれの*m/z*のMRMで定量イオン及び定性イオンを検出し、それぞれのピークの頂点の保持時間が標準品と一致している場合に、当該分析種のピークであると判定する。

8. 2 定量

ピーク面積比を用いた内標準法により行う。ピーク面積比は、分析種と内標準物質との面積比で求める。

$$\text{試料中濃度}(\mu\text{g/kg}) = \frac{P \times w(IS)}{P(IS)}$$

P：分析対象物質のピーク面積

W(IS)：試料中の内標準物質濃度 (μg/kg)

P(IS)：内標準物質のピーク面積

8. 3 Tf値による補正

3-MCPDからGEへの変換を補正するため、次式によりTf値を算出する。

$$\text{Tf値} = \frac{w(\text{グリシドール-d5})}{w(3\text{-MCPD-d5})}$$

$$w(\text{グリシドール}-d5) = \frac{P(\text{グリシドール}-d5) \times w(\text{グリシドール})}{P(\text{グリシドール})}$$

W(グリシドール-d5) : Tf試料中のグリシドール-d5濃度 (μg/kg)

W(3-MCPD-d5) : Tf試料中の3-MCPD-d5濃度 (μg/kg)

P(グリシドール-d5) : グリシドール-d5のピーク面積

W(グリシドール) : Tf試料中のグリシドール濃度 (μg/kg)

P(グリシドール) : グリシドールのピーク面積

算出したTf値を用いて、8. 2で算出したグリシドール濃度を次式により補正する。

$$w(\text{補正後グリシドール}) = w(\text{補正前グリシドール}) - (w(3 - MCPD) \times Tf)$$

W(補正後グリシドール) : Tf値で補正した試料中のグリシドール濃度 (μg/kg)

W(補正前グリシドール) : 8. 2で算出した試料中のグリシドール濃度 (μg/kg)

W(3-MCPD) : 試料中の3-MCPD濃度 (μg/kg)

9. 参考文献

- Kuhlmann J. et al. 2019. 2-Monochloropropanediol (2-MCPD)、3-Monochloropropanediol (3-MCPD) and Glycidol in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula: Single-Laboratory Validation、First Action 2018.12. J. AOAC Int. 102 (4) 1205-1220