

令和5年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：21454605

乳児用調製乳中のクロロプロパノール類及び関連物質の高感度分析法の開発

研究期間：令和3年度～令和4年度（2年間）

研究総括者名：水越 一史

試験研究機関名：一般財団法人日本食品分析センター

＜別紙様式 3＞最終年度報告書

1 研究目的

クロロプロパノール類及びその関連物質について、ヨーロッパを始めとした諸外国においては関心が非常に高く、規制の面では酸加水分解植物性たんぱく（アミノ酸液）を原料とする液体調味料、精製油脂及び当該油脂を使用した製品に対して基準値が設けられている。また、乳児用調製乳についてもEUでここ数年の間に基準値が設定されている。

一方で、日本国内においては、これら関連物質の基準値等は設定されておらず、国内の関係製造事業者が自主的に食品中のクロロプロパノール類及び関連物質の濃度低減に努めているほか、国としても含有実態調査を定期的に行っている。

分析法の整備という点では、油脂や一部加工食品を対象としたグリシドール脂肪酸エステル（GE）、3-MCPD脂肪酸エステル（3-MCPDE）及び2-MCPD脂肪酸エステル（2-MCPDE）の分析法は複数試験室で妥当性確認されたものがいくつかすでに存在しているが、乳児用調製乳を対象とした分析法は確立がなされていないのが現状である。

このため、本研究では、

1）乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの総量を定量できる間接分析法の開発

- i）方法精査
- ii）検証に使用する試料の入手
- iii）不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認
- iv）分析法の検証

2）単一試験室での妥当性確認

を実施することにより、

「乳児用調製乳中の3-MCPDE 及びGE が十分低い濃度範囲で精確に定量することが可能な分析法を確立する」ことを目標とする。

その結果、

- 1. 関係製造事業者による濃度低減の努力を科学的根拠に基づき評価できる。
- 2. 諸外国における規制に対応できていることを科学的根拠に基づき証明できる。
- 3. 国内製品の効率的な品質管理だけでなく、輸出拡大の観点からも有用となる。

ことが期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

3-クロロ-1、2-プロパンジオール（3-MCPD）については基準値がすでに世界各国で設けられているほか、GE及び3-MCPDEについてもEUでここ数年の間に基準値が設定されている。これはヨーロッパを始めとした諸外国において、クロロプロパノール類及び関連物質への関心が高まっていることを象徴している。

日本国内においては、これら関連物質の基準値等は設定されていないが、国内の関係製造事業者が自主的に食品中のクロロプロパノール類及び関連物質の濃度低減に努めているほか、国としても含有実態調査を定期的に行っている。

そのような背景のもと、AOAC Internationalの合同試験実施に向けて、乳児用調製乳中の3-MCPD、3-MCPDE、2-MCPD、2-MCPDE及びGEを精確に定量する方法として、以下2つの試験法が候補として挙げられている。

① 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

② Dubois M. et al. 2019. Determination of 2- and 3-MCPD as well as 2- and 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters (GE) in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Method, First Action 2018.03. J. AOAC Int. 102 (3) 903-914

①の方法はSGS社が開発した方法（以下、SGS法）であり、②の方法はネスレ社が開発した方法（以下、ネスレ法）である。いずれの方法も油脂を対象として妥当性が確認された分析法である「AOCS Official Method Cd 29b-13」及び「AOCS Official Method Cd 29a-13」を参考に、それらに油脂抽出工程並びに遊離型分析法を付け加えた構成となっている。しかし、その全工程を通じて精確な分析が可能であるかの検証はまだなされていない。よって今回、SGS法及びネスレ法によるクロロプロパノール類及び関連物質の精確な分析が可能か検証する。

検証に当たっては、まずは両方法を精査し、ハード的な面も考慮した実施の可能性を判断する。次に、実施不可能であれば代替法を、実施可能であっても、さまざまな分析機関で実施可能な分析法であることが望ましく、簡便かつ汎用性の高い代替法に置き換えることができるかどうかを検討する。

実行可能と判断された方法で妥当性評価を実施し、AOAC International¹又はEU²の定める性能基準と照合して性能を評価する。

1) 乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの総量を定量できる間接分析法の開発

（小課題責任者名 鳥海栄輔・研究機関 一般財団法人日本食品分析センター）

AOAC Internationalの合同試験の候補となっている2つの分析法について実施可能かを判断し、不可能な場合は実施可能な方法を開発する。具体的には、以下 i) ～ iv) を実施する。なお、ii) 及び iii) の試料の入手・調製に当たっては、製造者等業界関係者の協力を得ることを検討する。

i) 方法精査

1 http://www.eoma.aocac.org/SMPR/upload/99/SMPR%202017_017.pdf

2 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1577234511463&uri=CELEX:32019R2093>

AOAC International合同試験候補である2つの分析法(SGS法及びネスレ法)の論文に記載されている前処理法や測定方法を精査する。同時に国内外の分析機関においての導入を視野に入れ、簡便さ/汎用性という観点を軸に課題や問題点を列挙し、必要に応じ分析法の改良又は開発を検討する。

ii) 検証に使用する試料の入手

対象マトリクスである乳児用調製乳(粉)及び乳児用調製乳(液体)について、複数点の市販試料を購入し、既存の分析法(「平成26年度(2014)加工食品中の3-MCPD脂肪酸エステル及びグリシドール脂肪酸エステル含有実態調査」及び「平成28年度(2016):しょうゆ及びアミノ酸液中の3-MCPD含有実態調査」でそれぞれ用いられた分析法)で分析し、含有濃度をそれぞれ求め、検証に適した濃度既知試料を決定する。

iii) 不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認

牛乳もしくは牛乳を凍結乾燥させたものを不検出の疑似対象マトリクスとして適用できるかを検証する。検証により有効な試料が準備できれば、添加回収試験やSGS法で必要となるブランク試料に充当する。

iv) 分析法の検証

検証用試料もしくは不検出疑似対象マトリクスを用いて分析法の検証を行う。検証する分析法は合同試験候補であるSGS法及びネスレ法、あるいはi)の検討により改良又は開発された分析法を対象とする。

なお、改良・開発した分析法にて検証を実施する場合には、改良・開発した各工程が合同試験の候補とされている方法の工程と同等以上であることも合わせて確認する。

検証用試料を用いる場合はii)で分析して得られた濃度との比較により、不検出疑似対象マトリクスを用いる場合は添加回収試験により、それぞれ分析法性能を評価する。

2) 単一試験室での妥当性確認

(小課題責任者名 鳥海栄輔・研究機関 一般財団法人日本食品分析センター)

小課題1にて検証された分析法にて妥当性確認を実施する。分析法はAOAC International又はEUの定める性能規準と照合して性能を評価する。

(2) 達成目標及び進捗目標

合同試験の候補となっている2つの分析法あるいは簡便かつ汎用性の高い代替法も検討し、乳児用調製乳中の3-MCPDE 及びGE が十分低い濃度範囲で精確に定量することができる分析法を最低1つ確立する。

確立した分析法は妥当性評価を実施し、AOAC International又はEUの定める性能規準と照合して性能を評価する。

(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

行政施策として、乳児用調製乳中の3-MCPDE/GE の濃度低減のための努力を継続することを推奨しており、国内の関係製造事業者も自主的に食品中のクロロプロパノール類及び関連物質の濃度低減に努めている現状ではあるが、その成果(食品中の3-MCPDE/GE 濃度が低減したかどうか)を検証できる手段(妥当性が確認されている分析法)は確立されていない現状である。

研究成果として、乳児用調製乳中の3-MCPDE 及びGE が十分低い濃度範囲で精確に定量することが可能な分析法が確立することは濃度低減の検証に繋がり、諸外国における3-MCPDE/GE の規制に対応できていることを科学的根拠に基づき証明できることになる。開

発した分析法は、乳児用調製乳についての含有実態調査や国内製品の効率的な品質管理だけでなく、輸出拡大の観点からも有用となることが期待される。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度	
	令和3年度	令和4年度
1) 乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの総量を定量できる間接分析法の開発 i) 方法精査 ii) 検証に使用する試料の入手 iii) 不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認 iv) 分析法の検証 2) 単一試験室での妥当性確認	分析法の調査 分析法の調査 市販品の入手 市販品の入手・含有量調査 分析法の確立 室内妥当性評価	室内妥当性評価

※令和3年度の「分析法の検証」結果から、SGS法及びネスレ法ともに概ね良好な結果が得られた。一方で、それぞれにおいて、一部代替工程が必要となること、注意すべき事項が存在することも明確となり、当初の目的でもある、「さまざまな分析機関で実施可能であり、簡便かつ汎用性の高い分析法である」という視点では、SGS法の改変をもって妥当性確認を実施する分析法の手順を確定する方向を第一案とした。なお、令和3年度に予定した研究課題において、未着手となった部分があったため、令和4年度早期に確認・検証を追加し、その結果を踏まえた上で「小課題2. 単一試験室での妥当性確認」を実行した。

※黒実線：計画 赤点線：実行

(5) 実施体制

研究総括者及び研究員、研究項目	担当研究機関	研究担当者 ^(注)	エフォート (%)
研究総括者	一般財団法人日本食品分析センター	◎ 小木曾 基樹(～2022. 3)	1
1) 乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの総量を定量できる間接分析法の開発		◎ 水越 一史(2022. 4～)	2
i) 方法精査		○ 鳥海 栄輔	2 9
ii) 検証に使用する試料の入手		△ 小寺 和樹(～2021. 12)	1 4
iii) 不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認		△ 岩部 雄大	4 6
iv) 分析法の検証		△ 岩部 雄大 小寺 和樹(～2021. 12)	前出 前出
2) 単一試験室での妥当性確認		△ 岩部 雄大 小寺 和樹(～2021. 12) 近宗 雅人(2022. 10～) 伊藤 志保美(2022. 10～) 湯淺 友太郎(2022. 10～)	前出 前出 4 4 2
		○ 鳥海 栄輔	前出
		△ 岩部 雄大	前出
		富田 早由(2022. 4～)	8
		高橋 遼平(2022. 4～)	1 1

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(6) 各年度の研究費

令和3年度 8、614、425 円

令和4年度 7、663、000 円

3 研究推進会議の開催状況

別添のとおり。

4 研究成果の概要（別紙1参照）

（1）主な成果

1） 成果の内容

AOAC International合同試験候補である2つの分析法の精査・検証を行い、「さまざまな分析機関で実施可能であり、簡便かつ汎用性の高い分析法である」という視点から、SGS法を改変したものを分析方法として確立した。また、確立した分析法を用いて妥当性確認試験を行い、AOAC International又はEUの定める性能規準を満たすことを確認した。

2） 成果の活用

確立した分析方法は、乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの濃度低減の検証に繋がり、諸外国における3-MCPDE/GE の規制に対応できていることを科学的根拠に基づき証明できることになる。これにより、乳児用調製乳についての含有実態調査や国内製品の効率的な品質管理だけでなく、輸出拡大の観点からも有用となることが期待される。

（2）各研究課題の成果

1）小課題名：乳児用調製乳中の3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの総量を定量できる間接分析法の開発

（ア）研究目標

AOAC Internationalの合同試験の候補となっている2つの分析法により乳児用調製乳中の3-MCPDE 及びGE が十分低い濃度範囲で精確に定量することが可能かどうかを明らかにするとともに、その方法の汎用性も検討し、さまざまな分析機関で導入実施可能な分析法であるかも検証する。

（イ）研究内容

AOAC Internationalの合同試験の候補となっている2つの分析法（SGS法及びネスレ法）について、まずはその方法が実施可能かを判断し、不可能な場合は実施可能な方法を開発する。可能と判断された場合はその分析法の妥当性を検証する。具体的には、以下 i）～iv）を実施する。なお、ii）及びiii）の試料の入手・調製に当たっては、製造者等業界関係者の協力を得ることも検討する。

i）方法精査

SGS法及びネスレ法の論文に記載されている前処理法や測定方法を精査する。同時に国内外の分析機関においての導入を視野に入れ、簡便さ/汎用性という観点を軸に課題や問題点を抽出し、必要に応じ分析法の改良又は開発を検討する。

ii）検証に使用する試料の入手

検証に使用する試料の候補として国際的技能試験用試料、市販試料を検討し、本事業にて評価（検証）する2つの分析法への使用を試みる。

iii）不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認

牛乳もしくは牛乳を凍結乾燥させたものを不検出の疑似対象マトリクスとして適用できるか否かを検証する。検証により有効な試料が準備できれば、2つの分析法（SGS法及びネスレ法）あるいは必要に応じ改良又は開発した分析法の添加回収試験やSGS法でのブランク補正に必要な試料に充当する。なお、適用不可となった場合は委託者を通して乳業業界への協力要請等が可能か確認する等、不検出疑似対象マトリクスの扱い（運用）

について再考する。

iv) 分析法の検証

検証する分析法は合同試験法候補であるSGS法及びネスレ法、あるいはi) 方法精査の検討により改良又は開発された分析法を対象とする。なお、改良・開発した分析法にて検証を実施する場合には、改良・開発した各工程が合同試験の候補とされている方法の工程と同等以上であることも合わせて確認する。

(ウ) 研究結果

i) 方法精査

SGS法及びネスレ法に対して、論文記載の前処理法のフロー及び機器操作条件を図-1及び図-2に示した。また、両分析法を比較して、その概要及び特徴を表-1にまとめた。この際、変更点及び対応不可工程について、「原文からの変更等」として表-2及び3に示した。

《SGS法について》

原文において、測定時の試料導入部となる測定機器注入口にProgrammable Temperature Vaporizer (PTV) 装置を使用することになっているが、当該装置を保有していないため、対応が困難であることが判明した。GC-MS測定条件における本装置は、目的成分の感度、選択性に大きく関与し、分析値に影響を与える可能性が考えられた。この点について、機器メーカーに情報提供を依頼したところ、Multimode Inlet (MMI) を装備した機器が同様のシステムであるとの情報を得たため、MMI装備のガスクロマトグラフィー質量分析装置で対応した。なお、MMI装置も汎用的な装置ではないと考えられたため、一般的な試料導入方法であるスプリット/スプリットレス注入条件での代替法を検討候補とした。

《ネスレ法について》

油脂抽出工程で使用される「振とう抽出機」に関して、原文で用いることとなっていた特殊機器 (vertical shaker ; 縦振り高速振とう機) を保有しておらず、さらに、本機器は国内の他分析機関でも一般的に使用されている機器ではないと考えられたため、対応が困難であると判断した。そこで縦振り高速振とう機の代替として同等の機能が想定され、所有していた横型高速振とう機を使用することとした。また、本分析法は測定機器にGC-MS/MSを用いており、注入口にはMMIを、さらにバックフラッシュ機能を必要とする、かなり汎用性が低い仕様であると考えられた。ただし、原文において、MMIについて保有していない場合の代替手段が示されており、バックフラッシュ機能についても代替手段が示されていたことから、最終的にはバックフラッシュ機能はなしの条件で対応することとした。なお、SGS法でも記載の通り、GC-MS/MS測定条件は、目的成分の感度、選択性に大きく関与することが考えられ、バックフラッシュ機能は夾雑成分のイオン源導入を軽減できる、すなわち、イオン化部の汚染軽減につながり、目的成分の感度低下抑制にも影響があると考えられた。したがって、「振とう抽出機」の変更と合わせ、結果の評価は慎重に行った。

精査の結果、いずれの方法も原文の完全再現とはならなかったが、分析値に大きく影響する変更を伴うことなく、分析法の検証が行える状態に至った。SGS法及びネスレ法の再現性試験から見られた課題、メリット及びデメリット等については表-4にまとめた。ネ

スレ法では機器が縦振り高速振とう機やGC-MS/MSを使用しており、SGS法に比べて機器の汎用性が低いこと、結合型と遊離型が別抽出であり処理が煩雑であること、一度に抽出できる数に制限が生じることなどを考慮し、SGS法の検証を進めることとした。

表-1 2つの分析法比較（概要及び特徴）

方法		SGS法	ネスレ法
分析対象		【結合型】 2-MCPDE・3-MCPDE・GE 【遊離型】 2-MCPD・3-MCPD	
分析法	抽出	結合型と遊離型同時抽出	結合型と遊離型別抽出
	前処理	【遊離型（極性画分）】 PBAで誘導体化 【結合型（非極性画分）】 2-MCPDE、3-MCPDE及びGEを遊離化後、 グリシドールを臭素化により3-MBPD に変換 PBAで誘導体化	【遊離型】 PBAで誘導体化 【結合型】 固相カラム(NH ₂)精製実施 GEを臭素化により3-MBPDに変換後、 2-MCPDE、3-MCPDE及び3-MBPDを遊離 化 PBAで誘導体化
	測定 (機器)	GC-MS（注入口にはPTV）使用 使用カラム；DB-17（中極性）	GC-MS/MS（注入口にはMMI）使用 使用カラム；HP-5ms（微極性）
	定量	対象サロゲートによる1点比較 使用サロゲート 3-MCPD（遊離型）⇒ 3-MCPD- <i>d</i> ₅ 2-MCPD（遊離型）⇒ 2-MCPD- <i>d</i> ₅ 3-MCPDE（結合型） ⇒3-MCPD- <i>d</i> ₅ -ジオレエート 2-MCPDE（結合型） ⇒2-MCPD- <i>d</i> ₅ -ジパルミタート GE ⇒ オレイン酸グリシジル- <i>d</i> ₅	内部標準法 使用サロゲート 3-MCPD（遊離型）⇒ 3-MCPD- <i>d</i> ₅ 2-MCPD（遊離型）⇒ 2-MCPD- <i>d</i> ₅ 3-MCPDE（結合型） ⇒3-MCPD- <i>d</i> ₅ -ジパルミタート 2-MCPDE（結合型） ⇒2-MCPD- <i>d</i> ₅ -ジパルミタート GE ⇒ パルミチン酸グリシジル- <i>d</i> ₅

表-2 SGS法原文からの変更点等

原文項目	原文の記述	実施予定の条件
B. (h)	GC-MS (PTV付)	GC-MS (PTV無し)
E. (a) (1) 他	12 mL容スクリーバイアル	15 mL容ねじ口試験管
E. (a) (2)	メタノールを6±1 mL添加	メタノールを6 mL添加
E. (a) (2)	蓋をきつく締め、容器をプラスチックラックに水平にセットし超音波抽出	蓋をきつく締め、容器をプラスチックラックに立ててセットし超音波抽出
E. (a) (3) 他	3000 - 4000 rpmで1 - 5分間遠心	3000 rpmで1分間遠心
E. (a) (4) (6)	(4) 65-70 °Cで超音波抽出 (6) 65-75 °Cで超音波抽出	65 °Cで超音波抽出
E. (a) (7) 他	8 mL容スクリーバイアル	10 mL容ねじ口試験管
E. (a) (8) 他	窒素濃縮(40-50 °Cで加温可)	40 °Cで窒素濃縮
E. (b) (2) 他	ジエチルエーテルまたはジエチルエーテル+酢酸エチル(9+1)で抽出	ジエチルエーテル+酢酸エチル(9+1)で抽出
E. (C) (3)	水層を別の12 mLスクリーキャップバイアルにパスツールピペットを使って移す	洗浄工程のため、溶媒層を廃棄する
E. (C) (3)	イソヘキサン+ <i>t</i> -ブチルメチルエーテル(4+1)で1-2回、洗浄を繰り返す	イソヘキサン+ <i>t</i> -ブチルメチルエーテル(4+1)で2回洗浄を繰り返す(計3回洗浄)
E. (e) (1)	(分析対象物を含まない) コールドプレスオイル	コールドプレスで抽出されたオリーブオイル (分析対象物を含まないコールドプレスオイルは入手ができなかったため)
E. (e) (3)	イソヘキサン又はイソヘキサン+ <i>t</i> -ブチルメチルエーテル(4+1)2~3 mLで2~3回洗浄	イソヘキサン+ <i>t</i> -ブチルメチルエーテル(4+1)2 mLで3回洗浄

表-3 ネスレ法原文からの変更点等

原文項目	原文の記述	実施条件
A. (q)	バックフラッシュ装着GC-MS カラム2本連結 (バックフラッシュなしの場合 : one Agilent HP-5ms column (Part No. 19091S-433; 30 m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness)) 注入量 0.5 μL 昇温条件 ; 60 °C (1 min保持) → 10 °C/min昇温 → 200 °C → 25 °C/min 昇温 → 250°C	バックフラッシュなしのため GCカラム1本 (Φ0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μm) 注入量 0.5 μL 昇温条件 ; 60 °C (1 min保持) → 10 °C /min昇温 → 200 °C (0 min) → 25 °C /min昇温 → 320 °C (4 min)* *目的成分には影響しないタイミン グでのカラム中の高沸点物質の焼だ し
B. (h)	Geno/Grinder Vertical shaker	同等の機能が想定された横型高速振と う機 (水平振とう (ボールミルにアタ ッチメント装着))
E.	検量線の作成 マイクロピペットを 使用	溶解性の高い溶媒なのでマイクロシリ ンジ及びガスタイトシリンジを使用し た。
F. (a) & E	各標準原液の混合に当たり μLでの 採取が必要 (表2018. 03B)	標準原液濃度を変更し、混合時の採取 量を切りの良い数字とした。 PP-3&2-MCPD 1000→1064 mg/L (混合時の採取量 532→500 μL) Gly-P 1000→844 mg/L (混合時の採取量 422→500 μL) PP-3&2-MCPD-d5 1000→1025 mg/L (混合時の採取量 102.5→100 μL) Gly-P -d5 1000→803 mg/L (混合時の採取量 80.3→100 μL)
G. (b)	乳児用調製粉乳採取量 (脂質20~30% ならば0.5 g±0.05 g採取、脂質量 不明の時は2 g)。その後は、脂質 0.1 gを分取し、試験	採取量0.5 gだと分析値にばらつきが 生じたため、採取量を2 gとした。そ の時の脂質量が0.5 gであったため、 1/5分取することとした。 初めに添加するサロゲート量を 50→250 μLとした。
G. (8)	緩やかな窒素で50 μLまで濃縮	50 μLで止めるのは難しかったため、 サロゲートの面積値があまり変わらな かったことから、少々乾固したものを 用いた。また、試験管に固着した白い 残渣を超音波で剥離させた。
G. (8)	遠心1000×g、	回転数の変更→2500 rpm、5分間

表-4-1 2つの分析法比較（メリット/デメリット・課題）

	SGS法	ネスレ法
メリット	【機器・器具・試薬による制限】	
	・GC-MSでの分析が可能。	・試薬又は一部機器の条件（MMIの有無、バックフラッシュ機能の有無）について、代替手段の記載がある。
	【汎用性・簡便性に係る項目】	
	・添加したサロゲートとの1点比較で算出するため、検量線用の標準溶液を反応させる必要がなく、バッチ処理できる本数が多い。 ・粉末サンプルの場合、結合型と遊離型を同時抽出することが可能。	・粉末サンプルと液状サンプルで同じ試験法を適用可能
	【値の信頼度に係る項目】	
		・NH ₂ カラム精製工程により、モノアシルグリセロールおよびジアシルグリセロール由来の3-MBPD生成を抑制可能。ただし、完全ではない（カラム精製を実施しても、高温条件での注入により若干の生成懸念あり）。 ・検量線法のため基準値を満たす定量下限の設計が可能。
デメリット	【機器・器具・試薬による制限】	
		・1500 rpmで振とうできる振とう機、GC-MS/MSが必要。
	【汎用性・簡便性に係る項目】	
	・粉末サンプルと液状サンプルで抽出方法が異なる。	・検量線用の標準溶液を同時操作する関係上、バッチ処理できる数が少ない。
	【値の信頼度に係る項目】	
	・ブランクサンプルを用いたTf値の算出が必要。 ・抽出された油脂量が少ない場合、ブランクオイルを追加で加える必要があるため、目的物質が含有していないオイルを使用する必要がある。 ・臭素化工程以降の操作を迅速に行う必要がある。 ・カラム精製がないため、注入口での温度制御がシビア	・検量線にブランクオイルを用いており、測定下限も低いいため、目的物質が含有していないオイルを使用する必要がある。

表-4-2 2つの分析法比較（メリット/デメリット・課題）

	SGS法	ネスレ法
改良の余地	・測定機器がGC-MSであることから、上位機種であるGC-MS/MSの使用も可能。 ・モノアシルグリセロールおよびジアシルグリセロール由来の3-MBPD生成の影響が懸念される場合はNH₂カラム精製を加えることが可能。	
課題・問題点	・真値が判明しているサンプルや目的物質が含有していないサンプルの調達。 ・複数サンプルへの適用性確認。 ・定量下限の設定をどのように扱うか決める必要がある。 ・PTVがない場合の注入口温度の分析値に与える影響の確認が必要。	・真値が判明しているサンプルや目的物質が含有していないサンプルの調達。 ・複数サンプルへの適用性確認 ・ブランクオイルによる検量線への影響の調査。

(a) 粉末試料からの抽出

試料採取 2 g (1.99 g~2.01 g) 【12 mL容 スクリューキャップバイアル】

- + 遊離型サロゲート (3-MCPD及び2-MCPDとして1 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL
- + 結合型サロゲート (3-MCPD- d_5 として10 $\mu\text{g/mL}$ 、2-MCPD- d_5 及びグリシドール- d_5 として5 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL

溶媒抽出

- 1 回目：メタノール 6 mL $\pm$ 1 mL
- 2 回目：メタノール+*t*-ブチルメチルエーテル(1+1) 6 mL
- 3 回目：*t*-ブチルメチルエーテル 6 mL

ふたをしてすぐ攪拌（塊が崩れない場合はスパチュラ又はホモジナイザーを使用してくずす）

超音波抽出 15分間、1回目：65 $^{\circ}\text{C}$ 2回目：65 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$ 3回目：65 $^{\circ}\text{C}$ ~75 $^{\circ}\text{C}$

遠心分離 3000 rpm~4000 rpm、1分~5 分

上澄みをあわせる 【12 mL容スクリューキャップバイアル】

窒素濃縮(70 $^{\circ}\text{C}$)（溶媒抽出作業と並行して濃縮、溶媒がある程度なくなるまで）

- + 飽和硫酸ナトリウム溶液 4 mL
- + イソヘキサン+*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2.5 mL(2回繰り返す)

遠心分離

溶媒層 【8 mL スクリューキャップバイアル】

（あらかじめ容器の重さを測定する）

水層

(b) 遊離型の分析へ進む

窒素濃縮(40 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$)

(e) 結合型の分析へ進む

図-1-1 SGS 法分析フロー

(e) 結合型の分析

(a) 粉末試料からの抽出操作又は(d)液体サンプルからの結合型抽出操作で得られた溶媒層を濃縮したもの

質量測定

500 mg $\pm$ 50 mg に調整 多い場合は除去、少ない場合はブランクマトリクス（目的成分が入っていないオリーブオイルなど）を追加

+ *t*-ブチルメチルエーテル 3 mL

溶解後、-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ Cで15分間以上冷却

+ 0.6 g/100mL 水酸化ナトリウムのメタノール溶液* 1.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

エステル交換 -25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C、15~18時間*

+ 6.5 mL/L りん酸含有 600 g/L 臭化ナトリウム溶液* 2.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

混合し酸性化

10分間以上窒素濃縮しながらグリシドールを3-MBPDに変換

+ イソヘキサン又はイソヘキサン+*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2 mL~3 mL
(2回~3回繰り返す)

溶媒層を除去

+ ジエチルエーテル又はジエチルエーテル+酢酸エチル(9+1) 2 mL(3回繰り返す)

遠心分離 3000 rpm

溶媒層をスパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った8 mL スクリューキャップバイアルに移す

+ 5 mg/mLフェニルホウ酸のジエチルエーテル溶液 100 μ L

ボルテックス

窒素乾固

+ イソオクタン 300 μ L

遠心分離し、上清をバイアルに移す

GC-MS

* 週末をまたぐ場合はエステル交換反応を以下に変更可能

+ 0.25 g/100mL 水酸化ナトリウムのメタノール溶液 1.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

エステル交換 -25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C、62時間~66時間

+ 2.7 mL/L りん酸含有 600 g/L 臭化ナトリウム溶液 2.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

図-1-2 SGS 法分析フロー

(b) 粉末サンプルの遊離型の分析

(a) 粉末試料からの抽出操作で得られた水層

＋ イソヘキサン＋*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2.5 mL
水層(溶媒層を破棄)
＋ ジエチルエーテル又はジエチルエーテル＋酢酸エチル(9+1) 2 mL (3回繰り返す)
遠心分離
溶媒層をスパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った8 mL スクリューキャップ
バイアルに移す
＋ 5 mg/mLフェニルホウ酸のジエチルエーテル溶液 100 μ L
窒素乾固
＋ イソオクタン 300 μ L
遠心分離し、上清をバイアルに移す
GC-MS

(d) 液体サンプルからの結合型抽出

試料採取 14 g(13.93 g～14.07 g) 【50 mL 容スクリューキャップ遠沈管】
＋ 結合型サロゲート (3-MCPD- d_5 として10 μ g/mL、2-MCPD- d_5 及びグリシドール- d_5
として5 μ g/mL) 140 μ L
＋ 25 %水酸化アンモニウム溶液 4.2 mL
混合後、15 分間静置(室温)
＋ エタノール 20 mL
＋ ジエチルエーテル+石油エーテル(1+1) 10 mL (3 回繰り返す)
遠心分離
溶媒層を合わせる 【ディスポーザブルスナップキャップバイアル】
窒素濃縮(40 $^{\circ}$ C～50 $^{\circ}$ C) (抽出作業と並行して濃縮)
＋ イソヘキサン＋*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2 mL (2 回繰り返す)
溶媒層を合わせる 【8 mL スクリューキャップ】 (あらかじめ容器の重さを測定する)
窒素濃縮(40 $^{\circ}$ C～50 $^{\circ}$ C)
(e) 結合型の分析へ進む

図-1-3 SGS 法分析フロー

(c) 液体サンプルの遊離型の分析

試料採取 5 g (4.975 g～5.025 g) 【12 mL スクリューキャップバイアル】

- ＋ 遊離型サロゲート (3-MCPD及び2-MCPDとして1 μ g/mL) 200 μ L
- ＋ 6.5 mL/Lりん酸含有600 g/L臭化ナトリウム溶液 5 mL

混合後、凝集が起こるまで静置(2回繰り返す)

遠心分離 3000 rpm～4000 rpm、1分～5分

下層を合わせる 【12 mL スクリューキャップバイアル】

- ＋ イソヘキサン＋*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2.5 mL (2回～3回繰り返す)

遠心分離 3000 rpm～4000 rpm、1分～5分

水層(溶媒層を破棄)

- ＋ ジエチルエーテル又はジエチルエーテル＋酢酸エチル(9+1) 2.5 mL (3回繰り返す)

遠心分離 3000 rpm、1分

(エマルジョンの影響で溶媒層が取れない場合、水層を取り出し、残った溶媒層に無水硫酸ナトリウムを加えエマルジョンを壊した後溶媒層を分取)

溶媒層をスパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った8 mL スクリューキャップバイアルに移す

- ＋ フェニルホウ酸溶液 100 μ L

窒素乾固

- ＋ イソオクタン 300 μ L

上清をバイアルに移す(必要に応じて遠心分離)

GC-MS

(f) Tf値の算出

目的成分が入っていないスプレードライミルク

- ＋ 結合型サロゲート (3-MCPD-*d*₆として10 μ g/mL) 100 μ L
- ＋ オレイン酸グリシジル (グリシドールとして1 μ g/mL) 100 μ L

以下(a)及び(e)と同様操作

図-1-4 SGS 法分析フロー

機器操作条件

カラム：50 %ジフェニル50 %ジメチルポリシロキサン

φ 0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μm

注入方法：PTV、スプリットレス

温度：注入口 85 °C→300 °C/min昇温→165 °C(10分保持)→

300 °C/min昇温→320 °C(8分保持)

カラム 85 °C(0.5 min保持)→6 °C/min昇温→150 °C→12 °C/min昇温→

180 °C→25 °C/min昇温→280 °C(8 min保持)

ガス流量：ヘリウム 1 mL/min～1.5 mL/min

パージ流量：50 mL/min、0.5分～1分

注入量：1 μL～2 μL

トランスファライン温度：280 °C

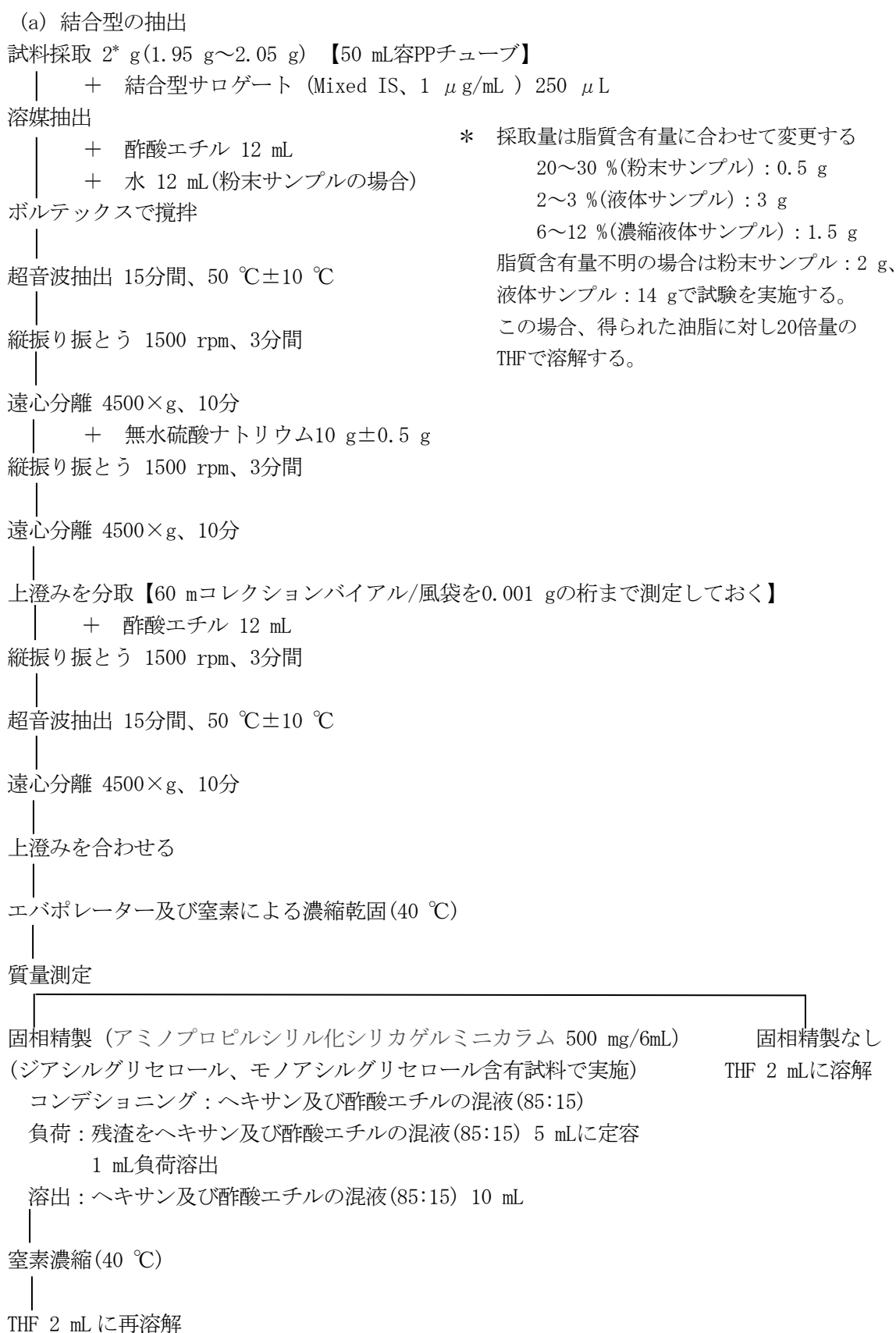
イオン源温度：230 °C

イオン化法：EI

Compound name	Target ion (<i>m/z</i>)	Dwell time(ms)	Compound name	Target ion (<i>m/z</i>)	Dwell time(ms)
3-MCPD	196	30	2-MCPD	196*	30
	147*	30		198	30
	198	30	2-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	201*	30
	146	30		203	30
3-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	201	30	3-MBPD	240*	30
	150*	30		242	30
	203	30	3-MBPD- <i>d</i> ₅ (IS)	245*	30
	149	30		247	30

* Quantifier ions

図-1-5 SGS 法機器操作条件



* 採取量は脂質含有量に合わせて変更する

20~30 % (粉末サンプル) : 0.5 g

2~3 % (液体サンプル) : 3 g

6~12 % (濃縮液体サンプル) : 1.5 g

脂質含有量不明の場合は粉末サンプル : 2 g、
液体サンプル : 14 gで試験を実施する。
この場合、得られた油脂に対し20倍量の
THFで溶解する。

図-2-1 ネスレ法分析フロー

(b) 前処理

(a)の操作で得られたTHF溶液

 | + 3 mg/mL臭化ナトリウム含有5 %硫酸 30 μ L

インキュベート(50 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C、15分間)

 | + 0.6 % 炭酸水素ナトリウム 3 mL

 | + ヘプタン 2 mL

ボルテックス 15秒間

 |

静置 (層が分かれなければ遠心分離 4500 $\times$ g、2分)

 |

上層を分取【10 mL容ガラスバイアル又は15 mL容PPチューブ】

 |

油のようなものが残るまで窒素濃縮(40 $^{\circ}$ C)

 |

THF 1 mLに溶解

 | + 1.8 v/v% 硫酸-メタノール 1.8 mL

ボルテックス 10秒間

 | 密栓

インキュベート(40 $^{\circ}$ C、16時間 $\sim$ 17時間)

 | + 飽和炭酸水素ナトリウム溶液 0.5 mL

ボルテックス 10秒間

 |

1 mL程度になるまで窒素濃縮(40 $^{\circ}$ C)

 | + 20 %硫酸ナトリウム溶液 2 mL

 | + ヘプタン 2 mL (2回繰り返す)

ボルテックス 10秒間

 |

遠心分離 1000 $\times$ g、1分間

 |

上層(ヘプタン層)除去

 | + 酢酸エチル 0.6 mL (3回繰り返す) 又は酢酸エチル 2 mL (2回繰り返す)

ボルテックス 10秒間

 |

上層(酢酸エチル層)を合わせる

 | + 4 %フェニルほう酸のジエチルエーテル溶液150 μ L

ボルテックス 15秒間

 |

超音波又はローテーターで振とう 5分間 (室温)

 |

必要に応じ超音波

 |

図-2-2 ネスレ法分析フロー

50 μ Lまで緩やかに窒素濃縮 (40 $^{\circ}$ C)
| + ヘプタン 1 mL
ボルテックス 15秒間
|
遠心分離 1000 rpm
|
上清をバイアルに移し、GC-MS/MSに注入

(C) 結合型の検量線溶液の前処理

標準溶液を分取

| + 結合型サロゲート (Mixed IS、1 μ g/mL) 50 μ L
| + ブランクオイル1滴 (有機菜種油、オリーブ オイルなど)
| + THF溶液2 mL

振とう 10秒間

|
以下 (b) 前処理と同様に操作

図-2-3 ネスレ法分析フロー

(c) 遊離型の分析

試料採取 2 g (1.99 g~2.01 g) 【50 mL容PPチューブ】

- + 遊離型サロゲート (遊離体 IS、1 μ g/mL) 100 μ L
- + 粉体試料なら水2 mLとセラミックホモジナイザーを加えて激しく振とう

溶媒抽出

- + ヘキサン及びアセトンの混液(1:1) 10 mL

縦振り振とう 1300 rpm、3分間

超音波抽出 5分間、室温

遠心分離 4500 $\times$ g、10分/中間層ができたたら振とう・遠心を繰り返す

上澄み(水層+有機層)すべてをとる(沈殿、固形残渣は捨てる) 【50 mL容PPチューブ】

- + 水 2 mL

縦振り振とう 1500 rpm、1分間

遠心分離 4500 $\times$ g、5分

水層 【10 mL容ガラスバイアル又は15 mL容PPチューブ】

窒素濃縮(40 $^{\circ}$ C)、約2 mLまで濃縮 (ヘキサン-アセトンを完全に飛ばす。水のみにする)

- + 無水硫酸ナトリウム 1 g
- + 酢酸エチル 0.6 mL (3回繰り返す) 又は酢酸エチル 2 mL (2回繰り返す)

ボルテックス 10秒間

遠心分離 1000 $\times$ g、2分間

10 mL容ガラスバイアル又は15 mL容PPチューブにあらかじめ少量の芒硝を加えておいたものに上層を分取

- + 4 %フェニルほう酸のジエチルエーテル溶液150 μ L

ボルテックス 15秒間

超音波又はローテーターで振とう 5分間 (室温)

50 μ Lまで緩やかに窒素濃縮 (40 $^{\circ}$ C)

- + ヘプタン 1 mL

ボルテックス15秒

遠心分離 1000 rpm

上清をバイアルに移し、GC-MS/MSに注入

図-2-4 ネスレ法分析フロー

機器操作条件

カラム：5 %ジフェニル-95 %ジメチルポリシロキサン

φ 0.25 mm×15 m、膜厚 0.25 μm (バックフラッシュありの場合)

φ 0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μm (バックフラッシュなしの場合)

注入方法：MMIスプリットレス (スプリット/スプリットレス注入口でもよい)

温度：注入口 80 °C (0.02 min保持)→500 °C/min昇温→300 °C

(ポストランは325 °C)

カラム 60 °C (1 min保持)→10 °C/min昇温→200 °C→25 °C/min昇温→

250 °C (ポストランは265 °C)

ガス流量：ヘリウム 1.2 mL/min

パージ流量：30 mL/min、3分後

注入量：0.5 μL

トランスファライン温度：280 °C

イオン源温度：280 °C

イオン化法：EI

溶媒待ち時間：3分

イオン取得グループ：①0-12.9分、②12.9-LAST分

Compound name	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)	Collision energy V	Time segment
3-MCPD	196*	147.1*	25*	5*	1
	147	91	25	20	1
3-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	150*	93*	25*	20*	1
	201	149.2	25	5	1
	201	92.1	25	25	1
2-MCPD	196*	104*	25*	15*	1、2
	198	104	25	15	1、2
	196	91	25	10	1、2
2-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	201*	104.1*	25*	30*	1、2
	201	106	25	10	1、2
3-MBPD	240*	147.1*	40*	5*	2
	147	91	40	15	2
	240	91.1	40	30	2
3-MBPD- <i>d</i> ₅ (IS)	150*	93*	40*	15*	2
	245	149.1	40	15	2
	245	92.1	40	35	2

* Quantifier ions

図-2-5 ネスレ法機器操作条件

ii) 検証に使用する試料の入手

研究課題にも記載の通り、検証に使用する試料の候補として国際的技能試験プログラム（以下、FAPAS）試料、市販試料を検討した。

国際的技能試験用の試料については、計画時にリアルタイムな対応ができなかったことから市販試料の購入を優先した。

市販試料購入については、濃度レベルが不明であったこと、また、2つの分析法での評価可能濃度レベルも未確認であったことから複数点を購入し、既存の別法であるDGF standard Methods C-VI18(10)を用いて含有濃度を求め、検証に適した濃度既知試料の決定を予定したが、事業開始後に以下の3点が判明したことから、SGS法での再現性試験実施を前提としつつ、市販品1試料について、低濃度域での分析法の性能検証に焦点を絞って検討を行うこととなった。

- ・SGS法が再現可能と判断できたこと
- ・令和2年度に別事業として実施されたSGS法での予備的性能検証の結果に関する情報を得て、市販品複数種の濃度レベルが把握できたこと
- ・令和2年度に実施されたSGS法での予備的性能検証の結果情報から、高濃度添加回収試験では比較的良好な結果であったが、バターミルクパウダーを用いた低濃度域（定量下限付近濃度）の添加回収試験ではばらつきが大きいという結果が得られたこと

市販品1試料について、SGS法を用いて分析を実施した結果、3-MCPDEで30 $\mu\text{g/kg}$ ～40 $\mu\text{g/kg}$ 、2-MCPDEで10 $\mu\text{g/kg}$ ～20 $\mu\text{g/kg}$ 、GEではばらつきは見られたものの、30 $\mu\text{g/kg}$ ～60 $\mu\text{g/kg}$ と推測（いずれも粉乳当たり）できた。この結果より、この試料での含有濃度が、EUにおける目標定量下限値（3-MCPDE：50 $\mu\text{g/kg}$ 、GE：20 $\mu\text{g/kg}$ ）付近であることが分かり、このレベルが十分に評価できれば、目標値を担保する性能評価に適した濃度レベルであると考えた。よって、当該試料を分析法の検証試験に適用することとした。

上記検証を得て、分析法適用確認に用いる市販の乳児用調製粉乳として、追加で代表的な国内製造事業者のうち、5製造事業者の主要な乳児用調製粉乳を入手した。一方で、FAPAS試料もT2666QC ; Infant Formulaを令和3年度に入手し、令和4年度には6月実施のFAPAS ラウンドNo. 2671へ参加した。

iii) 不検出疑似対象マトリクスの調製及び適用確認

3-MCPDE及びGEは油脂の精製工程で主に高温加熱した際に生成する化学物質であるため、熱をかけずに製造される粉乳の市販品を調査した結果、フリーズドライミルク（写真-1）の販売があり、調達した。一般的な乳児用調製粉乳との組成の比較は表-5に示した。SGS法を用いて3-MCPDE、2-MCPDE及びGEの含有濃度分析を実施したところ、含有濃度は、AOAC International又はEUの定める定量下限と比べて十分に低い結果であった。ただし、GEにおいては4～6 $\mu\text{g/kg}$ 程度、その他の物質についても1～2 $\mu\text{g/kg}$ の痕跡ピークが認められ、完全に不検出という結果ではなかったため、行政部局との調整により、妥当性確認の際の添加回収試験においては含有濃度を差し引きする対応をとることとした。

iv) 分析法の検証

《SGS法再現性確認及び検討》

SGS法において、原文通り実施できない点は測定機器試料導入部にPTV装置がない点であった。この点を除き概ね原文通りの分析法再現は可能であり、試料採取からの繰り返し試験を実施し、結果を表-6に示した。

この結果から以下2点の課題が確認された。

- ・ MCPDE及びGEにおけるクロマトグラムのピーク形状に異常が見られる
- ・ 結合型グリシドールのばらつきが大きい

クロマトグラムのピーク形状については、使用した分析カラムDB-17ms(中極性、 ϕ 0.25 mm $\times$ 30 m、膜厚 0.25 μ m)をネスレ法で使用されるカラムDB-5ms(微極性、 ϕ 0.25 mm $\times$ 30 m、膜厚 0.25 μ m)へ変更したところ、改善が見られた(図-3)。一方、結合型グリシドールのばらつきについては、以下に示す複数の要因が考えられた。

- ①臭素付加工程における反応不足
- ②GEをグリシドールに遊離化する工程時の3-MCPD生成
- ③原文との注入条件の違い(主に温度の影響)

①臭素付加工程について

臭素付加工程が要因と考える根拠として、2-MCPDE、3-MCPDEには全くばらつきがなく良好であること(2-MCPDE、3-MCPDEには臭素付加工程はない)が挙げられる。

そこで、エキストラバージンオリーブオイル(写真-2)をブランクオイルとして用い、添加回収試験(ブランクオイルにグリシドールとして0.25 μ g相当量を添加、エステル交換から実施)を繰り返し7回実施した。測定カラムはDB-5ms、注入口温度は320 $^{\circ}$ Cの条件とした。その結果、結合型グリシドールの結果も良好であった(表-7)。ブランクオイルでの試験と粉乳から抽出した油脂に対して実施した試験で異なった点として、後者ではエステル交換後に白色の沈殿物が確認され(図-4)、この沈殿物が、ばらつきに影響を及ぼしている可能性が示唆された。そのため、この課題に対しては、エステル交換後の反応の妨害の影響を確認する目的で、室温放置時間及び揮発性溶媒を飛ばす窒素濃縮時間の二点に着目し、検討を実施した。

なお、粉乳から抽出した油脂に対する以降の検討では、以下を前提として進めた。

- ・ 試料は粉乳から複数回(8~18回)抽出した油脂を混合し、「均一な粉乳からの抽出油脂」として調製したものを使用した。
- ・ いずれの検討試験も抽出油脂のエステル交換反応からの工程を実施した。
- ・ グリシドールの添加は、質量測定工程後におこなった。
- ・ 使用する試料(粉乳からの抽出油脂)はGEの含有試料であるため、添加回収試験実施の結果は含有濃度を差し引いて算出とした。

最初の確認として、臭素化溶液を加えた後の放置時間を延ばし、結果を比較した(表-8)。この結果、放置時間を長くすることで、平均回収率は上がったが、ばらつきが大きくなる傾向が確認された。数値があがったことで、反応不足を疑い、臭素付加工程の反応効率に影響を与える「揮発性溶媒を飛ばす窒素濃縮時間」に対しても追加で検討を実施した。本検討は繰り返し3回試験とした。窒素濃縮時間を長くしてもばらつきは解消されず、改善は見られなかった(表-8)。

②GEをグリシドールに遊離化する工程時の3-MCPD生成について

本分析法では制御は困難であるため、原文にも記載があるtransformation factor（以下、Tf値）による補正対応とした。

③原文との注入条件の違い（主に温度の影響）について

実行課題 i) で記述した通り、SGS法原文に示されているPTV装置での注入は、再現が不可能であったが、同性能システムであるMMIを使用した注入を実施した結果、結合型グリシドールにおいてもばらつきの顕著な減少が見られた（表-9）。MMI注入は注入口で昇温プログラム（85℃→300℃/min昇温→165℃（10 min保持）→300℃/min昇温→320℃（8 min保持））が組み立てられており、実際に目的成分が分離カラム（キャピラリーカラム）に入る温度帯は85℃～165℃の範囲となる。表-7に示したデータでは注入口温度は320℃であり、この点が大きな違いであった。この結果から注入時に3-MBPDの二次生成が起きている可能性が示唆され、この点について追実験を含む情報収集を実施したところ、二次生成に影響している成分は粉乳から抽出した油脂中に含まれるモノアシルグリセロール及びジアシルグリセロールであることが推定された¹⁾。

以上のことから、追加検討として、a) 注入口の温度を下げる、b) モノアシルグリセロール及びジアシルグリセロールを除去する工程を加える検討を実施することとした。

a) 注入口温度については、MMI注入時の上限温度である165℃に設定し、b) 二次生成原因物質の除去工程としては、ネスレ法でも使用されているアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（以下、NH₂ミニカラム）を用いて検討した。表-10及び表-11に示した結果から、NH₂ミニカラム精製がある場合は、ない場合と比較したところばらつきが小さかったため、NH₂ミニカラム精製を実施することで原因物質を除去でき、二次生成が抑えられることが確認できた。加えて、表-10及び表-11に示した結果から、注入口温度が165℃の場合、320℃と比較してばらつきが小さかったことから、温度制御がより重要であることが示された。

これら検討の結果から注入口温度を165℃に設定し、再度、再現性確認試験（7試行、試料採取からの繰り返し）を実施した結果を表-12に示した。また、それぞれの分析カラム（DB-17ms又はDB-5ms）における注入口温度の影響を確認するため、再現性確認再試験（試料採取から繰り返し7試験）の実施と合わせ、注入口温度を200℃、250℃及び320℃に設定し、それぞれの分析カラムでデータを取得した結果を表-13～表-15に示した。

SGS法における再現性確認再試験の結果から、まずクロマトグラムのピーク形状については、DB-17msにおいて320℃ではピーク形状に異常が見られ（ピークが2本に分離あるいはテーリング）、試行回による違いが生じたが、250℃以下でのピークはシャープで良好な形状であった（図-5）。このことから、ピーク形状の異常については注入口温度が250℃以下であれば大きな問題はないことが確認できた。また、注入口温度の分析値への影響については、両分析カラムともに、注入口温度が上がるにつれて、同一試料を分析しているにもかかわらずGE分析値（濃度）が高くなる傾向は同じであったが、DB-17msカラムでは、その上昇が顕著であった。165℃での2条件（DB-17ms及びDB-5ms）における結果はGE濃度のばらつきも小さく、断定まではできないが、おおよそ165℃での数値が妥当と判断できることから、200℃でもすでに2次生成の影響は生じていると思われる結果となった。

以上のことを考慮し、以下の①～⑥に示した事項の確認を行うこととした。

①不検出疑似対象マトリクスとして準備済みのフリーズドライミルクの適用可否

分析カラムとしてDB-5msとした場合のフリーズドライミルクにおけるMCPDE及びGEの含有濃度の分析結果を表-16～表-20に示した。MCPDEについては、いずれの温度帯でも定量値に影響のないレベル（定量下限10 $\mu\text{g/kg}$ に設定した場合で、ピークは検出されず、あるいは1 $\mu\text{g/kg}$ 程度）であった。一方で、GEについては、定量下限未満（定量下限10 $\mu\text{g/kg}$ に設定した場合）ではあったが、注入口の温度条件による違いが確認され、注入口温度が低い条件（165 $^{\circ}\text{C}$ 以下）であれば、当初に目標定量下限としたEUにおける基準値の2/5相当量（20 $\mu\text{g/kg}$ ）の1/3以下となることが確認される結果となった。結果として、フリーズドライミルクはブランク試料としての使用が可能であると判断した。なお、注入口温度を135 $^{\circ}\text{C}$ ～180 $^{\circ}\text{C}$ と変化させた場合、3-MCPDE及び2-MCPDEの数値に差はないが、GEの数値は温度が高くなるにつれて数値も高くなるという傾向はこれまでの検証時と同様であった。注入口での3-ブロモ-1、2-プロパンジオール（3-MBPD）の二次生成を抑制する目的で、 NH_2 ミニカラムによる精製も試みたが、本条件では抑制効果はほぼ得られなかった。

②国際的技能試験用試料での分析法検証

①と同様の方法を用いた場合の、令和3年度FAPAS試料（T2666QC ; Infant Formula）におけるMCPDE及びGEの含有濃度の分析結果を表-21～表-25に示した。GEはTf値による補正をしない値ではあるものの、注入口温度が低い条件（165 $^{\circ}\text{C}$ 以下）ではいずれの項目においてもZスコアは ± 2 以内（3-MCPDE : 0.1～0.6、2-MCPDE : 0.0～0.8、GE : -2.0～-0.6）であった。フリーズドライミルクにおける結果と同様に、注入口温度を135 $^{\circ}\text{C}$ ～180 $^{\circ}\text{C}$ まで変化させたところ注入口の温度上昇に伴ってGEの数値は高くなる傾向があり、 NH_2 ミニカラムによる二次生成の抑制効果がほぼ得られなかった。そのため、以降の検討では NH_2 ミニカラムを用いた精製は行わないものとした。

③PTV又は同等の機能を有する機器をGC-MS注入口に付け、原文で示されたプログラム通りの温度変化で実施したSGS法（原法）の再現性確認試験結果と、GC-MS注入口温度を165 $^{\circ}\text{C}$ に設定した場合における再現性試験結果の比較

フリーズドライミルク、FAPAS試料及び市販の乳児用調製粉乳に対して、注入口条件として、MMIを用い、SGS法原文と同条件（85 $^{\circ}\text{C}$ －300 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温－165 $^{\circ}\text{C}$ （10 min保持）－300 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温－320 $^{\circ}\text{C}$ （8 min保持））で注入した結果と、スプリット/スプリットレス注入口を用い、注入口温度を135 $^{\circ}\text{C}$ ～165 $^{\circ}\text{C}$ と変化させて注入したMCPDE及びGEの含有濃度の分析結果を表-26～表-34に示した。3-MCPDE及び2-MCPDEの数値はいずれの注入口条件でも同等であった。一方で、GEの数値は、MMI注入口とスプリット/スプリットレス注入口135 $^{\circ}\text{C}$ での数値は同等であるものの、注入口温度が高くなるにつれ数値が高くなる傾向は変わらないため、135 $^{\circ}\text{C}$ 測定においても3-MBPDの二次生成は頭打ちしていない可能性が示唆された。また、2-MCPDE- d_6 において、確認用の m/z 203においてピークトップが分離しない事例が発生した（図-6）。

そこで、注入口温度は120 $^{\circ}\text{C}$ と135 $^{\circ}\text{C}$ の2条件、測定カラムはDB-5msと原文通りのDB-17msの2条件に設定した測定を試みた。結果を表-35～表-37に示した。なお、本検討時には均一試料の使用が必須であるため、乳児用調製粉乳を8本分溶液化し、1本に混合後測定した。注入口温度については、3-MCPDE、2-MCPDE及びGEのいずれも同等の数値が得ら

れており、135℃での測定で二次生成が十分抑えられていると判断した。一方で、注入口での不揮発性成分の残存や溶媒（イソオクタン、沸点99℃）の揮発を考慮すると、注入口温度は高い方が好ましいため、3-MCPDの二次生成を抑えられている範囲でできるだけ高い温度である135℃に設定することとした。測定カラムについては、これまでの検討において、注入口温度が高いことによる形状のばらつきを考慮し、微極性であるDB-5msを用いていたが、低温ではピーク形状に問題がないこと、また、2-MCPD-*d*₆のピーク前後の夾雑成分の影響（図-7）を考慮し、SGS法の原文通りのカラムである、中極性のDB-17msを用いることとした。

図-8にこれまでの検討により決定した、最終的な抽出条件及び測定条件を示した。この方法をSGS法（改変）とし、以降の検討は図-8の条件にて実施した。

④SGS法（改変）における、Tf値を考慮しての分析値の確認

ブランク試料としてフリーズドライミルクを用い、SGS法の原文の通りに、3-MCPD-*d*₆として1μg相当量、グリシドールとして0.1μg相当量を添加し、Tf値を算出した（表-38）。試行3で日にちを分けて2回実施したところ、数値に差がみられなかったため、2回分、試行6の平均値である2.4%をTf値として計算に用いることとした。

また、Tf値を算出するにあたり、無添加のフリーズドライミルクも同時に分析したところ、以下の2点が新たに判明した。

- 1) 2-MCPD-*d*₆の*m/z*203には夾雑ピークが認められる（図-9）
- 2) 3-MCPD-*d*₆のみを添加した場合においても、2-MCPD-*d*₆の定量用及び確認用のいずれの*m/z*でもピークが認められる（図-10）

今回判明した2点については、分析上避けられないものであるが、1)については定量イオンである*m/z*201にはピークが認められないことから、このピークは2-MCPDではなく、定量イオンの数値には問題ないと判断した。2)については分析法の性質上、サロゲート添加は必須であり、2-MCPD-*d*₆を加えた場合のピークと比較すると小さいことから、分析数値への影響は小さいと判断した。

⑤SGS法（改変）において、添加回収試験による遊離体の評価

遊離の3-MCPD及び2-MCPDについてはこれまで検討用として用いていた乳児用調製粉乳及びフリーズドライミルクいずれにおいても含有していなかった。そのため、遊離体の評価として目標定量下限値である50μg/kg相当量の添加回収試験を行った結果を表-39に示した。試行3で実施したところ、3-MCPD及び2-MCPDのいずれも添加回収率は良好であった。

なお、2-MCPDにおいて、確認用の*m/z*198を用いると④で判明した1)の影響により、添加回収率は低く計算されてしまったため、ほかの*m/z*について測定が可能か試みた。しかし、ほかの*m/z*では夾雑の影響がより大きく、確認用として*m/z*198以上に最適なものを見つけることはできなかった。今回の検討結果から乳児用調製粉乳において2-MCPDが検出されることはほぼ無いことも考慮し、SGS法原文通り、定量用として*m/z*196、確認用として*m/z*198を用いることとした。

⑥SGS法（改変）において、複数試料（製造事業者違い6種類）での分析法検証

SGS法（改変）を用い、6製造事業者の代表的な乳児用調製粉乳におけるMCPDE及びGEの含有濃度を試行3で分析した結果を表-40～表-45に、クロマトグラムの一例を図-11～図

-16に示した。いずれの乳児用調製粉乳においても抽出及び測定は問題なく実施可能であり、各含有濃度のばらつきも小さい結果であった。

また、FAPAS ラウンドNo. 2671に参加した結果を表-46に示した。いずれの結果もZスコアは±2以内であった。ただし、GEの含有濃度が今回の事業でも目標としている定量下限（10 μ g/kg）と比較して低いためか、参加19機関中10機関がZスコア2を超える数値となっており、信頼性の面では若干の懸念は残る結果であった。

液状乳の方法について

市販の乳児用調製粉乳を包装に既定の割合（粉乳13 gに対して水100 mL）で溶かしたもののについて、SGS法（原法）の液状乳の条件で抽出、SGS法（改変）の測定条件で分析を実施し、結果を粉乳当たりの数値に換算したものを表-47に示した。3-MCPDE、2-MCPDE及びGEについては粉乳に対する方法で試験した結果（表-48）とほぼ同等の値が得られた。また、液状乳としての定量下限は、粉乳に対する方法と同程度のピークまで確認できると仮定した場合、粉乳の定量下限が10 μ g/kg、採取量が2 g、液状乳の採取量が14 gであることから、結合型の定量下限値は $10 \times 2 / 14 = 1.4$ μ g/kg程度と推定された。

《ネスレ法再現性確認》

ネスレ法において、原文通り実施できない点のうち、分析値に影響が大きいと考えられた点は油脂抽出工程で実施する「振とう抽出」手法及び注入条件でのバックフラッシュ機能の2点であった。2点については代替手段を検討し、代替手段において再現性確認試験（試行7、試料採取からの繰り返し）分析を実施し、結果を表-49に示した。

ネスレ法においては、前処理工程において、モノアシルグリセロール及びジアシルグリセロールを除去する工程が含まれていることもあり、結合型グリシドールのばらつきは小さく、SGS法と同様に2-MCPDE、3-MCPDEのばらつきもない結果であった。得られた結果をSGS法と比較したところ、2-MCPDE、3-MCPDE及びGEすべてがSGS法での1/2程度の含有濃度となり、その結果について調査した。この結果、ネスレ法で標準溶液調製時に添加するブランクオイル中に対象物質が含まれており、実際の値よりも低く見積もられる検量線となっていたことが判明した。ブランクオイルの影響を補正した結果は、SGS法と同等の値を示した（表-49中カッコ内の値）。

表-5 乳児用調製粉乳とフリーズドライミルクの組成比較

	乳児用調製粉乳	フリーズドライミルク
たんぱく質(g/100kcal)	1.8～3.0	5.19
脂質(g/100kcal)	4.4～6.0	5.66
炭水化物(g/100kcal)	9.0～14.0	7.08

表-6 SGS法による室内再現精度確認結果
(市販の乳児用調製粉乳を使用、結果は粉乳当たり)

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	37.3	14.8	39.8
2	33.6	14.3	76.2
3	35.2	14.5	55.8
4	35.1	14.1	69.8
5	37.8	14.1	128.2
6	35.6	13.8	71.8
7	33.1	14.2	64.1
平均値	35.4	14.3	72.2
標準偏差	1.7	0.3	27.5
相対標準偏差(%)	4.9	2.3	38.1

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 ; 320 °C

注入方法 ; スプリットレス

表-7 粉乳から複数回抽出し、均一化した油脂を用いた添加回収試験結果

試行	GE添加回収率(%)		
	粉乳抽出油脂 放置時間0分	粉乳抽出油脂 放置時間30分	ブランクオイル 放置時間0分
1	78.6	84.3	97.5
2	80.8	91.6	93.8
3	77.6	91.6	94.0
4	78.2	107.7	93.3
5	79.3	78.5	93.2
6	80.4	117.9	92.3
7	78.5	86.3	94.4
平均値	79.0	93.9	94.1
標準偏差	1.2	13.9	1.7
相対標準偏差(%)	1.5	14.8	1.8

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

添加量 ; 0.25 μg 相当 (グリシドールとして)

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 ; 320 °C

注入方法 ; スプリットレス

回収率は油脂含有濃度を差し引いて算出

(油脂含有濃度 : 放置時間0分時 ; 101.7 $\mu\text{g/kg}$ 、放置時間30分時 ; 191.9 $\mu\text{g/kg}$)

表-8 室温放置時間及び揮発性溶媒を飛ばす窒素濃縮時間の変更検討結果
(粉乳から抽出し、均一化した油脂中の濃度)

試行	GE(グリシドール当量)測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	放置時間0分 窒素濃縮時間20分	放置時間30分 窒素濃縮時間20分	放置時間0分 窒素濃縮時間60分	放置時間30分 窒素濃縮時間60分
1	104.5	145.2	95.8	172.2
2	101.2	136.1	124.6	146.6
3	148.7	129.7	137.7	174.5
平均値	118.1	137.0	119.4	164.4
標準偏差	26.5	7.8	21.4	15.5
相対標準偏差(%)	22.5	5.7	18.0	9.4

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 ; 320 °C

注入方法 ; スプリットレス

表-9 粉乳から複数回抽出し、均一化した油脂を用いた添加回収試験結果 (注入口 : MMI)

試行	GE添加回収率(%)		
	粉乳抽出油脂 放置時間0分	粉乳抽出油脂 放置時間30分	ブランクオイル 放置時間0分
1	81.4	90.7	89.9
2	82.6	88.9	86.0
3	80.7	83.9	88.0
4	80.3	88.9	88.0
5	78.5	86.0	86.5
6	82.5	85.9	89.0
7	81.5	84.0	88.9
平均値	81.1	86.9	88.0
標準偏差	1.4	2.6	1.4
相対標準偏差(%)	1.8	3.0	1.6

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

添加量 ; 0.25 μg 相当 (グリシドールとして)

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 (MMIによる昇温条件) ; 85 °C-300 °C/min昇温-165 °C(10 min)-300 °C
/min昇温-320 °C(8 min)

ページ開始時間 : 1 min

回収率は油脂含有濃度を差し引いて算出

(油脂含有濃度 : 放置時間0分時 ; 71.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、放置時間30分時 ; 76.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

表-10 粉乳から抽出し、均一化した油脂中の濃度

試行	GE(グリシドール当量)測定値(μ g/kg)			
	NH ₂ ミニカラム精製なし		NH ₂ ミニカラム精製あり	
	放置時間0分 窒素濃縮時間20分	放置時間30分 窒素濃縮時間60分	放置時間0分 窒素濃縮時間20分	放置時間30分 窒素濃縮時間60分
1	104.5	172.2	78.3	88.9
2	101.2	146.6	85.5	93.7
3	148.7	174.5	90.1	85.1
平均値	118.1	164.4	84.6	89.2
標準偏差	26.5	15.5	5.9	4.3
相対標準偏差	22.5	9.4	7.0	4.8

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 ; 320 °C

注入方法 ; スプリットレス

表-11 粉乳から抽出し、均一化した油脂中の濃度

試行	GE(グリシドール当量)測定値(μ g/kg)			
	NH ₂ ミニカラム精製なし		NH ₂ ミニカラム精製あり	
	放置時間0分 窒素濃縮時間20分	放置時間30分 窒素濃縮時間60分	放置時間0分 窒素濃縮時間20分	放置時間30分 窒素濃縮時間60分
1	76.6	93.5	74.7	73.4
2	79.1	90.7	74.5	74.9
3	84.0	93.9	74.0	73.8
平均値	79.9	92.7	74.4	74.0
標準偏差	3.8	1.7	0.4	0.8
相対標準偏差	4.7	1.9	0.5	1.1

ブランク試料を用いてのTf値考慮せず

測定カラム ; DB-5ms

注入口温度 ; 165 °C

注入方法 ; スプリットレス

表-12 SGS 法による室内再現精度確認結果（粉乳当たり、注入口温度:165 °C）

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)					
	測定カラム：DB-17ms			測定カラム：DB-5ms		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	34.5	13.8	24.1	31.6	13.0	20.5
2	33.8	13.9	23.8	31.7	13.0	20.7
3	33.9	14.7	25.2	32.5	12.9	20.6
4	33.4	14.4	25.3	32.3	13.2	21.1
5	33.4	14.0	26.1	31.4	13.0	21.7
6	33.7	13.7	27.6	31.9	12.9	21.8
7	34.2	14.2	27.1	31.6	13.0	21.6
平均値	33.8	14.1	25.6	31.9	13.0	21.1
標準偏差	0.4	0.36	1.4	0.4	0.1	0.56
相対標準偏差(%)	1.2	2.5	5.6	1.3	0.8	2.6

ブランク試料を用いての Tf 値考慮せず
注入方法；スプリットレス

表-13 SGS法による室内再現精度確認結果（粉乳当たり、注入口温度:200 °C）

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)					
	測定カラム：DB-17ms			測定カラム：DB-5ms		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	33.6	14.1	40.9	32.0	12.9	27.3
2	33.6	14.6	42.9	32.0	12.8	25.8
3	33.9	14.4	41.1	32.6	13.0	25.5
4	33.3	14.8	45.4	31.5	12.7	26.1
5	34.4	14.9	49.1	31.3	12.9	25.8
6	33.7	14.2	49.0	31.5	13.0	27.8
7	33.8	14.2	45.6	30.8	12.8	28.0
平均値	33.8	14.5	44.9	31.7	12.9	26.6
標準偏差	0.3	0.3	3.4	0.6	0.1	1.1
相対標準偏差(%)	1.0	2.2	7.6	1.8	0.9	4.0

ブランク試料を用いての Tf 値考慮せず
注入方法；スプリットレス

表-14 SGS法による室内再現精度確認結果（粉乳当たり、注入口温度:250 ℃）

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)					
	測定カラム：DB-17ms			測定カラム：DB-5ms		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	34.0	14.3	45.5	32.0	12.8	39.2
2	34.9	14.9	50.7	31.6	13.1	37.6
3	34.1	14.6	47.9	31.7	13.0	35.2
4	34.5	15.0	56.9	32.7	13.0	35.9
5	34.6	15.0	69.4	31.5	13.0	38.3
6	34.4	14.7	87.4	31.6	12.7	50.2
7	34.0	14.5	67.8	31.1	13.1	40.4
平均値	34.4	14.7	60.8	31.7	13.0	39.5
標準偏差	0.3	0.27	15.0	0.5	0.2	5.0
相対標準偏差(%)	1.0	1.8	24.7	1.6	1.2	12.7

ブランク試料を用いての Tf 値考慮せず

注入方法；スプリットレス

表-15 SGS法による室内再現精度確認結果（粉乳当たり、注入口温度:320 ℃）

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)					
	測定カラム：DB-17ms			測定カラム：DB-5ms		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	38.0	14.9	216.2	32.7	13.3	78.3
2	35.5	14.0	203.5	32.0	13.9	76.3
3	34.7	14.8	146.3	32.8	13.8	61.4
4	34.7	15.0	174.8	32.5	13.1	69.0
5	35.4	15.1	203.6	33.0	13.6	67.5
6	38.0	15.2	263.6	33.0	13.2	114.4
7	34.7	15.1	186.5	34.4	12.9	81.0
平均値	35.9	14.9	199.2	32.9	13.4	78.3
標準偏差	1.5	0.4	36.6	0.7	0.4	17.3
相対標準偏差(%)	4.2	2.7	18.4	2.3	2.8	22.2

ブランク試料を用いての Tf 値考慮せず

注入方法；スプリットレス

表-16 フリーズドライミルクの試験結果(注入口温度:135℃) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	tr	tr	(2.9)	tr	tr	(2.3)
2	tr	tr	(3.1)	tr	tr	(3.5)
3	tr	tr	(3.8)	tr	tr	(4.1)
平均値	—	—	3.3	—	—	3.3
標準偏差	—	—	0.5	—	—	0.9
相対標準偏差(%)	—	—	14.5	—	—	27.8

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-17 フリーズドライミルクの試験結果(注入口温度:150℃、1回目) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	tr	tr	(1.3)	tr	tr	(1.6)
2	tr	tr	(1.8)	tr	tr	(2.1)
3	tr	tr	(1.9)	tr	tr	(3.1)
平均値	—	—	1.7	—	—	2.3
標準偏差	—	—	0.3	—	—	0.8
相対標準偏差(%)	—	—	19.3	—	—	33.7

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-18 フリーズドライミルクの試験結果(注入口温度:150℃、2回目*) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	tr	tr	(8.3)	tr	tr	(7.7)
2	tr	tr	(7.3)	tr	tr	(7.7)
3	tr	tr	(7.5)	tr	tr	(9.4)
平均値	—	—	7.7	—	—	8.3
標準偏差	—	—	0.5	—	—	1.0
相対標準偏差(%)	—	—	6.9	—	—	11.9

*数値比較のため別日で再測定

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-19 フリーズドライミルクの試験結果(注入口温度:165℃) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	tr	tr	(4.3)	tr	tr	(3.4)
2	tr	tr	(4.2)	tr	tr	(3.8)
3	tr	tr	(5.3)	tr	tr	(4.5)
平均値	—	—	4.6	—	—	3.9
標準偏差	—	—	0.6	—	—	0.6
相対標準偏差(%)	—	—	13.2	—	—	14.2

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-20 フリーズドライミルクの試験結果(注入口温度:180 °C) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	tr	tr	(8.5)	tr	tr	(5.4)
2	tr	tr	(8.1)	tr	tr	(4.9)
3	tr	tr	(9.2)	tr	tr	(6.0)
平均値	—	—	8.6	—	—	5.4
標準偏差	—	—	0.6	—	—	0.6
相対標準偏差(%)	—	—	6.5	—	—	10.1

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-21 FAPAS試料(T2666QC)の試験結果(注入口温度:135 °C) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	32.0	13.1	10.5	32.8	13.2	10.4
2	32.6	13.0	10.7	33.8	13.3	11.3
3	31.9	13.3	10.5	33.0	13.1	10.2
平均値	32.2	13.1	10.6	33.2	13.2	10.6
標準偏差	0.4	0.2	0.1	0.5	0.1	0.6
相対標準偏差(%)	1.2	1.2	1.1	1.6	0.8	5.5

表-22 FAPAS試料(T2666QC)の試験結果(注入口温度:150 °C、1回目) (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	28.9	10.4	(8.7)	34.3	11.5	(9.2)
2	29.8	10.9	(8.3)	34.3	12.0	(9.1)
3	29.5	11.5	(8.5)	33.7	11.8	(8.9)
平均値	29.4	10.9	8.5	34.1	11.8	9.1
標準偏差	0.5	0.6	0.2	0.3	0.3	0.2
相対標準偏差(%)	1.6	5.0	2.4	1.0	2.1	1.7

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

表-23 FAPAS試料(T2666QC)の試験結果(注入口温度:150℃、2回目*)(単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	31.9	13.1	12.7	33.1	12.9	14.5
2	33.3	13.4	13.6	33.1	13.2	12.9
3	31.8	13.0	12.1	33.1	13.0	12.5
平均値	32.3	13.2	12.8	33.1	13.0	13.3
標準偏差	0.8	0.2	0.8	0	0.2	1.1
相対標準偏差(%)	2.6	1.6	5.9	0	1.2	8.0

*数値比較のため別日で再測定

表-24 国際的技能試験用試料(T2666QC)の試験結果(注入口温度:165℃)(単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	30.1	11.7	10.1	33.9	11.9	10.0
2	31.2	11.6	11.0	34.9	12.2	(9.9)
3	30.4	11.8	10.9	33.9	12.2	(9.6)
平均値	30.6	11.7	10.7	34.2	12.1	9.8
標準偏差	0.6	0.1	0.5	0.6	0.2	0.2
相対標準偏差(%)	1.9	0.9	4.6	1.7	1.4	2.1

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

表-25 FAPAS試料(T2666QC)の試験結果(注入口温度:180℃)(単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	NH ₂ カラム精製なし			NH ₂ カラム精製あり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	30.0	11.7	14.5	33.7	11.7	12.0
2	31.0	11.5	14.4	34.0	12.0	10.9
3	30.2	11.6	12.6	34.2	11.5	10.7
平均値	30.4	11.6	13.8	34.0	11.7	11.2
標準偏差	0.5	0.1	101	0.3	0.3	0.7
相対標準偏差(%)	1.7	0.9	7.7	0.7	2.2	6.3

表-26 フリーズドライミルクの3-MCPDE (3-MCPD 当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	tr	tr	tr	tr
2	tr	tr	tr	tr
3	tr	tr	tr	tr
平均値	—	—	—	—
標準偏差	—	—	—	—
相対標準偏差(%)	—	—	—	—

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-27 フリーズドライミルクの2-MCPDE (2-MCPD 当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	tr	tr	tr	tr
2	tr	tr	tr	tr
3	tr	tr	tr	tr
平均値	—	—	—	—
標準偏差	—	—	—	—
相対標準偏差(%)	—	—	—	—

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

tr: 定量下限未満、数値化が適切でない痕跡ピーク

表-28 フリーズドライミルクのGE (グリシドール当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	(5.0)	(6.7)	(2.3)	(3.4)
2	(3.9)	(5.2)	(3.2)	(4.2)
3	(3.7)	(5.9)	(4.0)	(4.7)
平均値	4.2	5.9	3.2	4.1
標準偏差	0.7	0.8	0.9	0.7
相対標準偏差(%)	16.7	12.7	26.9	16.0

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

表-29 FAPAS試料(T2666QC)の3-MCPDE(3-MCPD当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	32.5	32.3	31.9	28.3
2	32.6	32.4	32.7	30.1
3	32.2	32.6	31.7	30.2
平均値	32.4	32.4	32.1	29.5
標準偏差	0.2	0.2	0.5	1.1
相対標準偏差(%)	0.6	0.5	1.7	3.6

表-30 FAPAS試料(T2666QC)の2-MCPDE(2-MCPD当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	(9.7)	(9.5)	(9.4)	(8.2)
2	10.0	(9.7)	(9.4)	(8.1)
3	(9.6)	(9.6)	(9.5)	(8.1)
平均値	9.8	9.6	9.4	8.1
標準偏差	0.2	0.1	0.1	0.1
相対標準偏差(%)	2.1	1.04	0.6	0.7

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

表-31 FAPAS 試料(T2666QC)のGE(グリシドール当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	10.8	11.1	10.8	(9.8)
2	(9.4)	10.5	(9.9)	(8.8)
3	10.2	11.4	11.2	12.9
平均値	10.1	11.0	10.6	10.5
標準偏差	0.7	0.5	0.7	2.1
相対標準偏差(%)	6.9	4.2	6.3	20.4

定量下限: 10 $\mu\text{g/kg}$

() の数値: 定量下限を下回るが数値化可能なレベル

表-32 乳児用調製粉乳の3-MCPDE (3-MCPD当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	34.2	34.9	34.6	33.2
2	35.0	35.0	33.9	33.2
3	34.6	35.3	34.7	32.9
4	35.3	35.2	35.1	33.9
5	34.5	34.2	34.5	33.0
6	35.6	35.7	35.3	33.7
7	35.9	36.4	35.8	33.8
平均値	35.0	35.2	34.8	33.4
標準偏差	0.6	0.7	0.6	0.4
相対標準偏差(%)	1.8	1.9	1.8	1.2

表-33 乳児用調製粉乳の2-MCPDE (2-MCPD当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	14.0	13.9	13.8	13.3
2	14.1	13.9	13.6	11.6
3	14.1	13.9	13.7	11.7
4	14.1	14.1	13.8	12.3
5	13.8	13.9	13.5	12.8
6	14.0	14.0	13.9	12.4
7	14.3	14.2	14.1	12.6
平均値	14.1	14.0	13.8	12.4
標準偏差	0.2	0.1	0.2	0.6
相対標準偏差(%)	1.1	0.9	1.4	4.8

表-34 乳児用調製粉乳のGE(グリシドール当量) の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	注入口条件			
	135 °C	150 °C	165 °C	MMI注入口
1	23.2	24.6	25.0	23.6
2	22.2	24.7	25.9	24.6
3	22.4	24.4	25.9	22.7
4	25.5	28.5	29.4	24.3
5	23.4	25.6	28.0	22.9
6	24.6	26.0	27.9	21.8
7	24.9	28.5	32.0	27.2
平均値	23.7	26.0	27.7	23.9
標準偏差	1.3	1.8	2.4	1.8
相対標準偏差(%)	5.4	6.8	8.8	7.4

表-35 均一試料における3-MCPDE (3-MCPD当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行		DB-5ms		DB-17ms	
		注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C	注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C
1日目	1回目	33.8	36.0	34.7	35.6
	2回目	34.1	34.4	34.7	35.4
2日目	1回目	33.7	33.1	34.7	35.0
	2回目	33.1	33.4	35.0	35.0
3日目	1回目	33.7	32.9	34.6	33.8
	2回目	32.7	33.3	34.7	34.8
4日目	1回目	32.4	33.4	34.8	35.1
	2回目	32.9	33.1	35.0	35.1
5日目	1回目	34.1	35.9	34.8	34.9
	2回目	33.6	34.7	34.0	35.1
平均		33.4	34.0	34.7	35.0

表-36 均一試料における2-MCPDE (2-MCPD当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行		DB-5ms		DB-17ms	
		注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C	注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C
1日目	1回目	14.1	14.2	13.6	14.0
	2回目	13.9	14.0	13.8	13.9
2日目	1回目	13.9	13.8	13.7	13.7
	2回目	13.6	13.7	13.8	14.1
3日目	1回目	13.4	13.7	14.1	13.8
	2回目	13.5	13.6	13.9	14.1
4日目	1回目	13.5	13.4	14.1	14.1
	2回目	13.2	13.4	14.0	13.9
5日目	1回目	13.9	14.0	14.1	14.0
	2回目	13.8	13.8	14.2	14.1
平均		13.7	13.8	13.9	14.0

表-37 均一試料におけるGE(グリシドール当量)の試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行		DB-5ms		DB-17ms	
		注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C	注入口温度 120 °C	注入口温度 135 °C
1日目	1回目	21.5	21.9	21.3	21.5
	2回目	21.6	21.9	21.2	21.6
2日目	1回目	21.8	21.8	21.4	21.3
	2回目	21.5	21.8	21.1	21.3
3日目	1回目	21.7	22.2	21.3	21.6
	2回目	21.9	22.4	21.3	21.4
4日目	1回目	21.2	21.3	21.6	21.5
	2回目	21.2	21.9	21.4	21.8
5日目	1回目	21.1	21.3	21.4	21.7
	2回目	21.8	21.7	21.7	21.6
平均		21.5	21.8	21.4	21.5

表-38 Tf値の算出結果(%)

試行		分析結果
1回目	1	2.37
	2	2.45
	3	2.47
2回目	1	2.48
	2	2.44
	3	2.12
平均値		2.4
標準偏差		0.05
相対標準偏差(%)		2.2

表-39 遊離体の添加回収試験結果 (単位: %)

試行	3-MCPD	2-MCPD
1	90.1	87.4
2	94.7	88.1
3	86.9	87.8
平均値	90.6	87.8
標準偏差	3.9	0.4
相対標準偏差(%)	4.3	0.4

表-40 粉乳①の分析試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	40.2	13.5	24.5	23.5
2	np	np	38.9	13.8	23.6	22.6
3	np	np	39.3	14.6	23.9	22.9
平均値	—	—	39.5	14.0	24.0	23.0
標準偏差	—	—	0.7	0.6	0.5	0.5
相対標準偏差(%)	—	—	1.7	4.1	1.9	2.0

np: 痕跡なし

表-41 粉乳②の分析試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	43.4	14.1	26.3	25.2
2	np	np	41.6	13.2	23.9	22.9
3	np	np	44.3	14.3	24.0	22.9
平均値	—	—	43.1	13.9	24.7	23.7
標準偏差	—	—	1.4	0.6	1.4	1.3
相対標準偏差(%)	—	—	3.2	4.2	5.5	5.6

np: 痕跡なし

表-42 粉乳③の分析試験結果 (単位: $\mu\text{g/kg}$)

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	66.5	19.0	13.3	11.7
2	np	np	64.5	19.6	12.7	11.1
3	np	np	65.6	19.2	12.6	11.0
平均値	—	—	65.5	19.3	12.9	11.3
標準偏差	—	—	1.0	0.3	0.4	0.4
相対標準偏差(%)	—	—	1.5	1.6	3.0	3.4

np: 痕跡なし

表-43 粉乳④の分析試験結果（単位： $\mu\text{g/kg}$ ）

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	67.5	26.1	33.8	32.1
2	np	np	68.3	25.2	34.4	32.7
3	np	np	64.9	24.8	35.1	33.5
平均値	—	—	66.9	25.4	34.4	32.8
標準偏差	—	—	1.8	0.7	0.7	0.7
相対標準偏差(%)	—	—	2.7	2.6	1.9	2.1

np：痕跡なし

表-44 粉乳⑤の分析試験結果（単位： $\mu\text{g/kg}$ ）

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	49.4	17.9	42.9	41.7
2	np	np	51.5	18.1	42.7	41.4
3	np	np	49.4	17.9	42.6	41.4
平均値	—	—	50.1	18.0	42.7	41.5
標準偏差	—	—	1.2	0.1	0.2	0.2
相対標準偏差(%)	—	—	2.4	0.6	0.4	0.4

np：痕跡なし

表-45 粉乳⑥の分析試験結果（単位： $\mu\text{g/kg}$ ）

試行	遊離型		結合型			
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正前	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	47.7	17.3	31.4	30.2
2	np	np	40.9	16.8	32.1	31.1
3	np	np	49.1	17.6	33.9	32.7
平均値	—	—	45.9	17.2	32.5	31.3
標準偏差	—	—	4.4	0.4	1.3	1.3
相対標準偏差(%)	—	—	9.6	2.3	4.0	4.0

np：痕跡なし

表-46 FAPAS ラウンドNo. 2671における分析試験結果(μg/kg)

	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
分析結果	66.5	28.0	4.9
assigned value	60.7	26.0	7.37
zスコア	0.4	0.3	-1.5

表-47 液状乳の方法で試験し、粉乳当たりで計算した含有濃度(μg/kg)

試行	遊離型		結合型		
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	34.8	13.8	21.2
2	np	np	34.5	13.7	20.7
3	np	np	35.8	13.5	20.1
平均値	—	—	35.0	13.7	20.7
標準偏差	—	—	0.7	0.2	0.6
相対標準偏差(%)	—	—	1.9	1.1	2.7

np：痕跡なし

表-48 粉乳の方法で試験した含有濃度(μg/kg)

試行	遊離型		結合型		
	3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量) Tf値補正後
1	np	np	40.2	13.5	23.5
2	np	np	38.9	13.8	22.6
3	np	np	39.3	14.6	22.9
平均値	—	—	39.5	14.0	23.0
標準偏差	—	—	0.7	0.6	0.5
相対標準偏差(%)	—	—	1.7	4.1	2.0

np：痕跡なし

表-49 ネスレ法による室内再現精度確認結果（市販の乳児用調製粉乳を使用）

試行	結合型測定値 ($\mu\text{g/kg}$)					
	粉乳当たり			抽出油脂当たり		
	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1	18.2 (35.4)	7.5 (13.1)	25.9 (33.3)	68.4 (132.8)	28.3 (49.2)	97.1 (125.0)
2	18.6 (35.9)	7.5 (13.1)	31.0 (38.5)	72.4 (139.3)	29.3 (51.1)	120.3 (149.3)
3	18.4 (35.6)	7.1 (12.7)	30.5 (38.0)	68.4 (132.5)	26.4 (47.3)	113.4 (141.2)
4	18.5 (35.7)	7.2 (12.8)	29.5 (37.0)	68.3 (131.8)	26.7 (47.3)	109.2 (136.7)
5	18.9 (36.1)	7.6 (13.2)	28.9 (36.4)	68.7 (131.3)	27.8 (48.1)	105.2 (132.3)
6	19.2 (36.4)	7.1 (12.7)	28.8 (36.3)	74.5 (141.3)	27.9 (49.6)	111.9 (140.9)
7	18.5 (35.7)	7.4 (13.0)	29.0 (36.5)	68.4 (132.1)	27.3 (48.0)	107.4 (135.0)
平均値	18.6 (35.8)	7.3 (12.9)	29.1 (36.6)	69.9 (134.4)	27.7 (48.7)	109.2 (137.2)
標準偏差	0.3 (0.3)	0.2 (0.2)	1.6 (1.7)	2.5 (4.1)	1.0 (1.4)	7.2 (7.7)
相対標準偏差(%)	1.8 (0.9)	2.8 (1.6)	5.6 (4.6)	3.6 (3.0)	3.6 (2.9)	6.6 (5.6)

（ ）は使用オイルのブランク値考慮

使用オイル；オリーブオイル試薬（富士フイルム和光純薬製）

算出方法；検量線濃度0として調製する溶液（標準溶液を含まない溶液）の応答値を各濃度応答値から差し引き

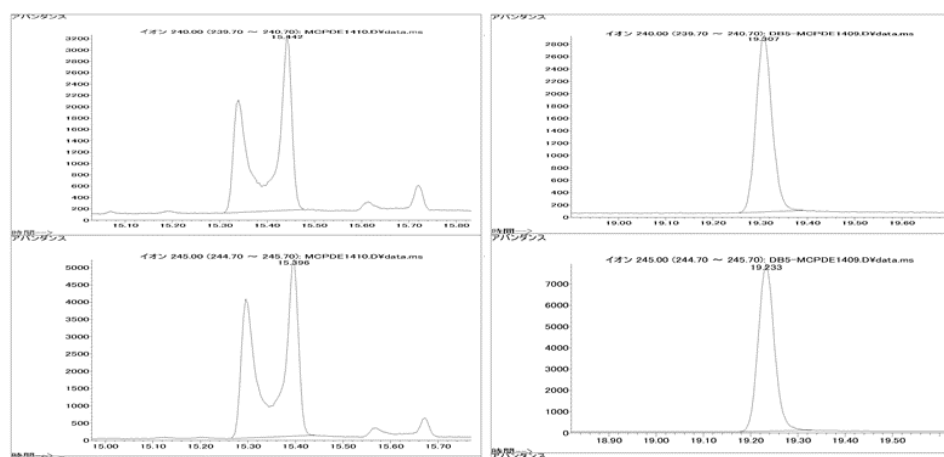
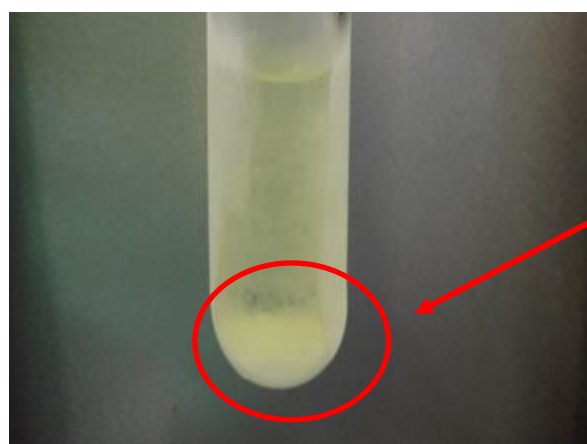


図-3 測定カラムによる違い（左；DB-17ms、右；DB-5ms）
（上段；3-MBPD誘導体化合物； m/z 240、下段；3-MBPD- α_5 誘導体化合物； m/z 245）



ブランクオイルでは見られなかった白色沈殿が確認された

図-4 粉乳から抽出した油脂における臭素付加工程前の写真

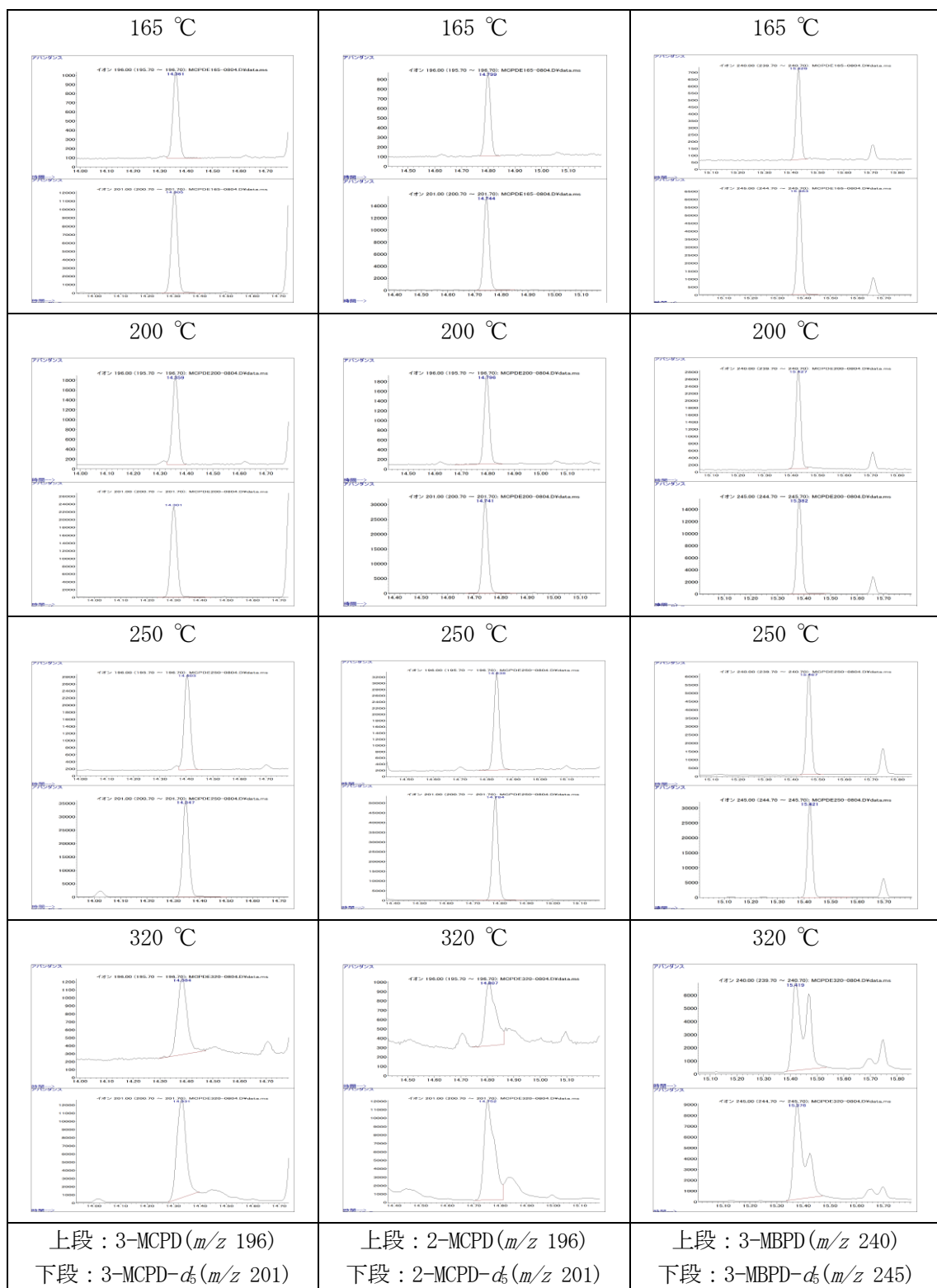
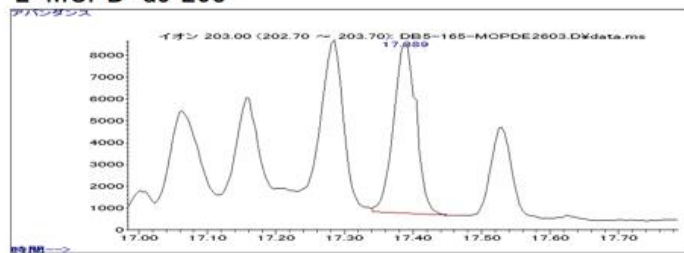
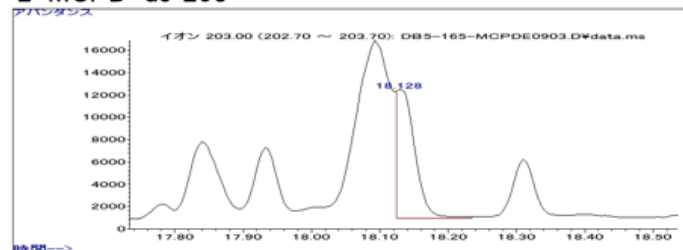


図-5 DB-17ms における注入温度を変更した場合のクロマトグラムの一例

2-MCPD-d5 203



2-MCPD-d5 203



2-MCPD-d5 203

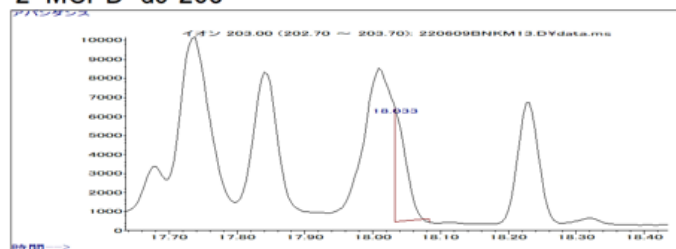
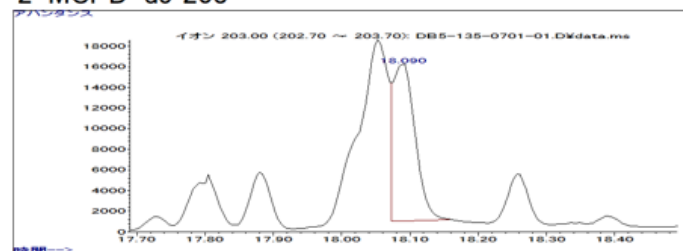


図-6 DB-5ms の Lot 違いにおける 2-MCPD- d_5 (m/z 203) のクロマトグラム
(上段：カラム①、中段：カラム②、下段：機器メーカー保有カラム)

2-MCPD-d5 203



2-MCPD-d5 203

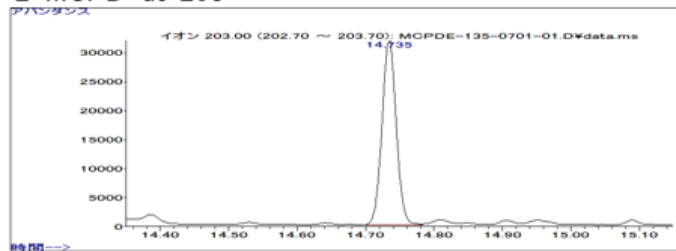


図-7 カラム違いにおける 2-MCPD- d_5 (m/z 203) のクロマトグラム
(上段：DB-5ms、下段：DB-17ms)

(a) 粉末試料からの抽出

試料採取 2 g (1.99~2.01 g) 【15 mL容ねじ口試験管】

- + 遊離型サロゲート (3-MCPD及び2-MCPDとして1 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL
- + 結合型サロゲート (3-MCPD- d_5 として10 $\mu\text{g/mL}$ 、2-MCPD- d_5 及びグリシドール d_5 として5 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL

溶媒抽出

- 1回目: メタノール 6 mL
- 2回目: メタノール+*t*-ブチルメチルエーテル(1+1) 6 mL
- 3回目: *t*-ブチルメチルエーテル 6 mL

ふたをしてすぐ攪拌 (塊が崩れない場合はスパチュラ又はホモジナイザーを使用してくずす)

超音波抽出 15分間、1回目~3回目すべて: 65 $^{\circ}\text{C}$

遠心分離 3000 rpm、1分間

上澄みをあわせる 【15 mL容ねじ口試験管】

窒素濃縮(70 $^{\circ}\text{C}$) (溶媒抽出作業と並行して濃縮、溶媒がある程度なくなるまで)

- + 飽和硫酸ナトリウム溶液 4 mL
- + イソヘキサン+*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2.5 mL (2回繰り返す)

ボルテックス 5秒間×2回

遠心分離 3000 rpm、1分間

溶媒層 【10 mL容ねじ口試験管】

(あらかじめ容器の重さを測定する)

水層

(b) 遊離型の分析へ進む

窒素濃縮(40 $^{\circ}\text{C}$)

(e) 結合型の分析へ進む

図-8-1 SGS 法 (改変) の分析フロー (下線は原文からの変更点)

(e) 結合型の分析

(a) 粉末試料からの抽出操作又は(d)液体サンプルからの結合型抽出操作で得られた溶媒層を濃縮したもの

質量測定

500 mg $\pm$ 50 mg に調整 多い場合は除去、少ない場合はオリーブオイルを追加
+ *t*-ブチルメチルエーテル 3 mL

ボルテックス 5秒間 $\times$ 1回

溶解後、-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ Cで15分間以上冷却

+ 0.6 g/100mL 水酸化ナトリウムのメタノール溶液* 1.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

ボルテックス 5秒間 $\times$ 1回

エステル交換 -25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C、15 $\sim$ 18時間*

+ 6.5 mL/L りん酸含有 600 g/L 臭化ナトリウム溶液* 2.4 mL (-25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)

混合 (ボルテックス 5秒間 $\times$ 2回) し酸性化

20分間窒素濃縮しながらグリシドールを3-MBPDに変換

+ イソヘキサン+*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2 mL(3回繰り返す)

ボルテックス 5秒間 $\times$ 2回

遠心分離 3000 rpm、1分間

溶媒層を除去

+ ジエチルエーテル+酢酸エチル(9+1) 2 mL(3回繰り返す)

ボルテックス 5秒間 $\times$ 2回

遠心分離 3000 rpm、1分間

溶媒層をスパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った10 mL容ねじ口試験管に移す

+ 5 mg/mLフェニルホウ酸のジエチルエーテル溶液 100 μ L

混合 ボルテックスミキサー、5秒 $\times$ 2回

窒素乾固 (室温)

+ イソオクタン 300 μ L

遠心分離 (3000 rpm、1分間) し、上清をバイアルに移す

GC-MS

図-8-2 SGS法(改変)の分析フロー(下線は原文からの変更点)

(b) 粉末サンプルの遊離型の分析

(a) 粉末試料からの抽出操作で得られた水層

+ イソヘキサン+*t*-ブチルメチルエーテル(4+1) 2.5 mL
 水層(溶媒層を破棄)
 + ジエチルエーテル+酢酸エチル(9+1) 2 mL(3回繰り返す)
 遠心分離 3000 rpm、1分間
 溶媒層をスパチュラ1杯分程度の無水硫酸ナトリウムの入った10 mL容ねじ口試験管に移す
 + 5 mg/mLフェニルホウ酸のジエチルエーテル溶液 100 μ L
 窒素乾固
 + イソオクタン 300 μ L
 遠心分離 (3000 rpm、1分間) し、上清をバイアルに移す
 GC-MS

機器操作条件

カラム : DB-17ms ϕ 0.25 mm $\times$ 30 m、膜厚 0.25 μ m
 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
 温度 : 注入口 135 $^{\circ}$ C
 カラム 85 $^{\circ}$ C (0.5 min保持) $\rightarrow$ 6 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$ 150 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 12 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$
 180 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 25 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C (8 min保持)
 ガス流量 : ヘリウム 1.0 mL/min
 パージ流量 : 50mL/min、1分
 注入量 : 1 μ L
 トランスファライン温度 : 280 $^{\circ}$ C
 イオン源温度 : 230 $^{\circ}$ C
 イオン化法 : EI

Compound name	Target ion (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)	Compound name	Target ion (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)
3-MCPD	<u>196*</u>	30	2-MCPD	196*	30
	147	30		198	30
	198	30	2-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	201*	30
	146	30		203	30
3-MCPD- <i>d</i> ₅ (IS)	<u>201*</u>	30	3-MBPD	240*	30
	150	30		242	30
	203	30	3-MBPD- <i>d</i> ₅ (IS)	245*	30
	149	30		247	30

* Quantifier ions

図-8-3 SGS 法 (改変) の分析フロー及び機器操作条件 (下線は原文からの変更点)

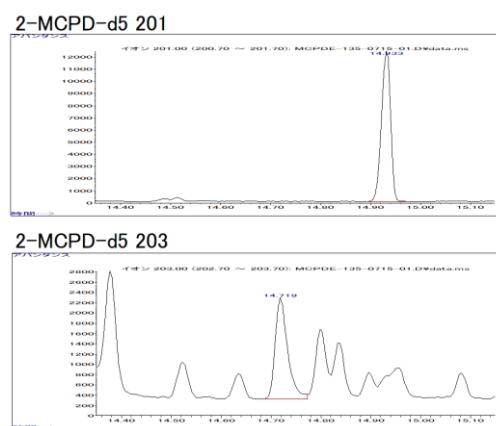


図-9 フリーズドライミルクにおける 2-MCPD- d_5 のクロマトグラム

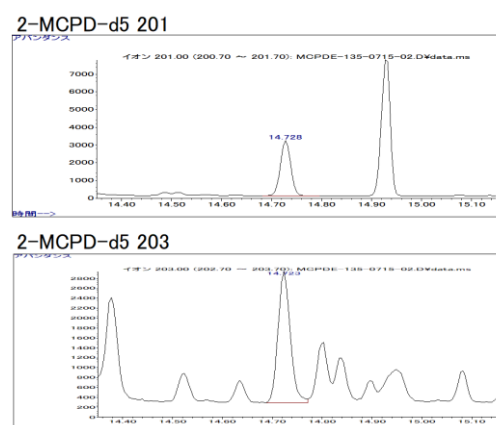
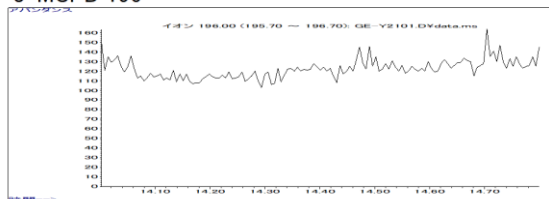


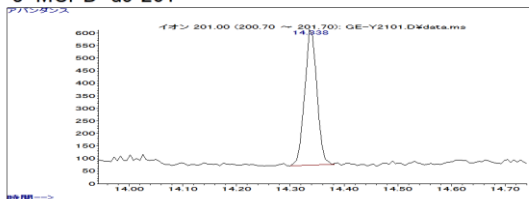
図-10 3-MCPDE- d_6 のみを添加した場合における 2-MCPD- d_5 のクロマトグラム

遊離型

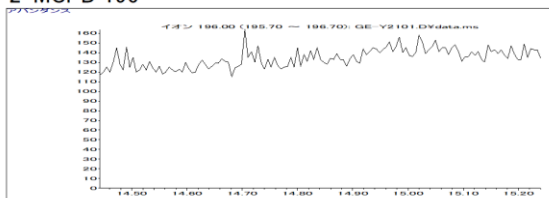
3-MCPD 196



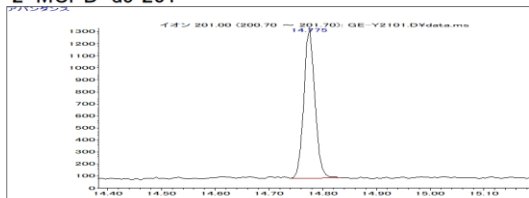
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

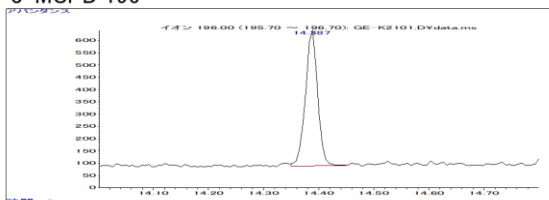


2-MCPD-d5 201

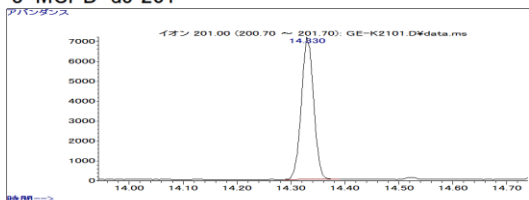


結合型

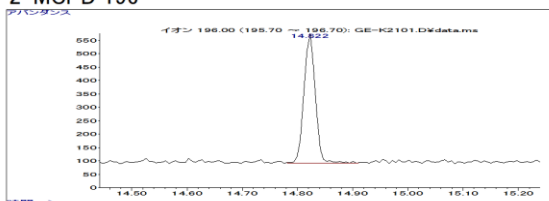
3-MCPD 196



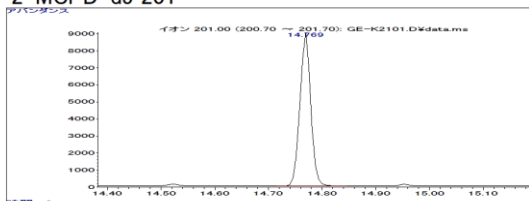
3-MCPD-d5 201



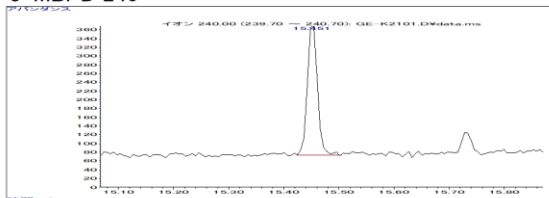
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

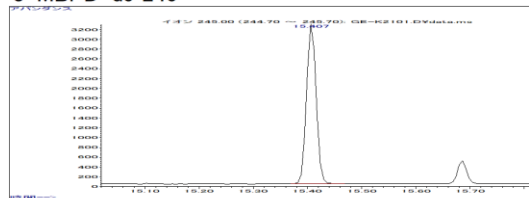
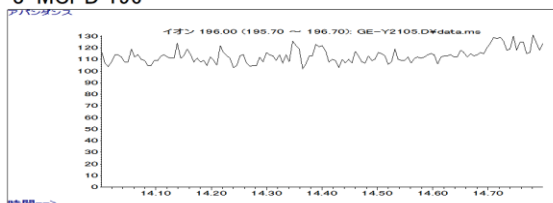


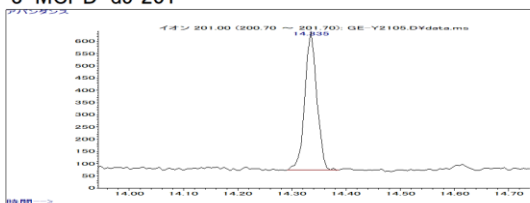
図-11 粉乳①のクロマトグラムの一例

遊離型

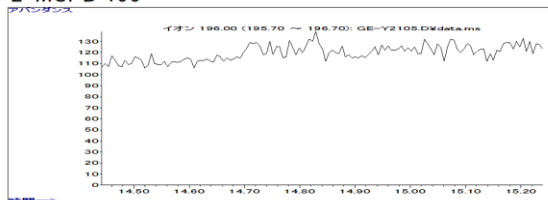
3-MCPD 196



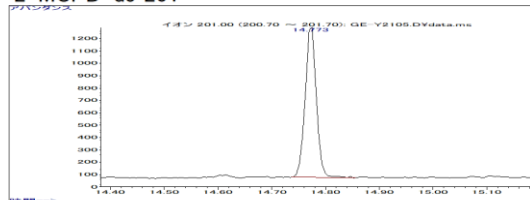
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

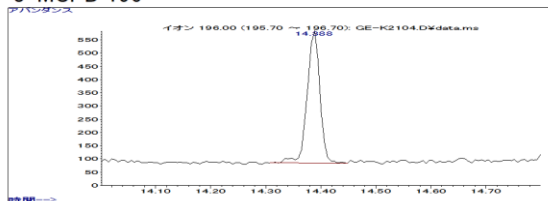


2-MCPD-d5 201

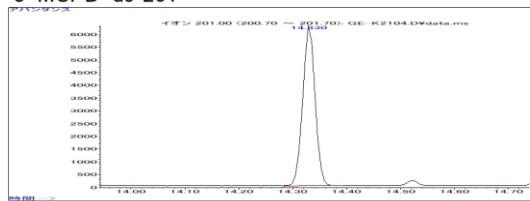


結合型

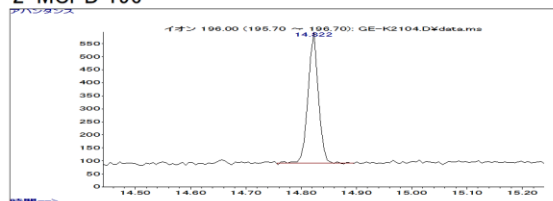
3-MCPD 196



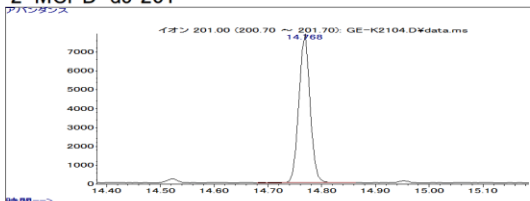
3-MCPD-d5 201



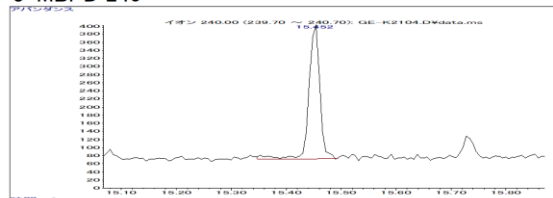
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

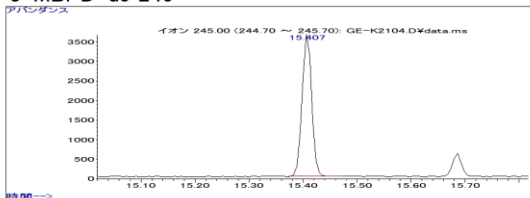
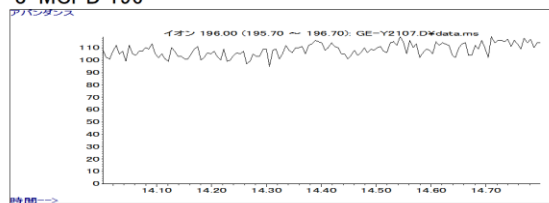


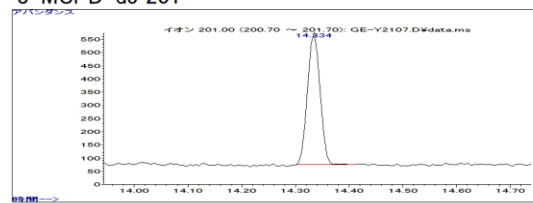
図-12 粉乳②のクロマトグラムの一例

遊離型

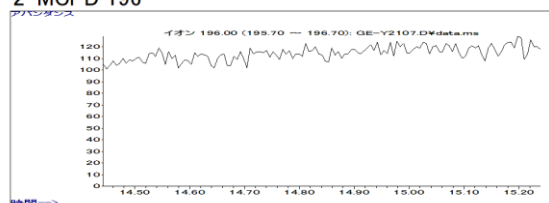
3-MCPD 196



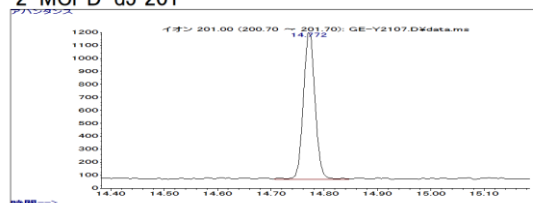
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

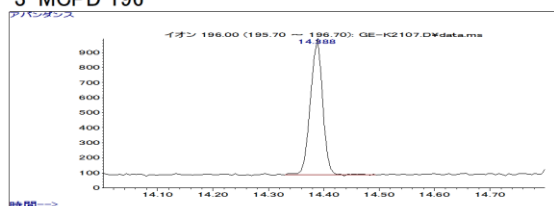


2-MCPD-d5 201

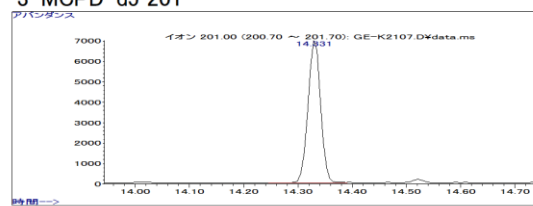


結合型

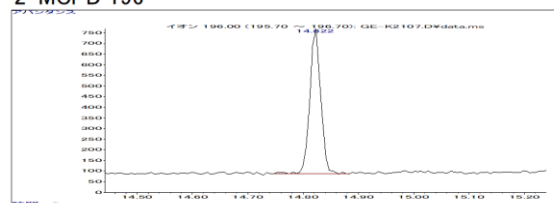
3-MCPD 196



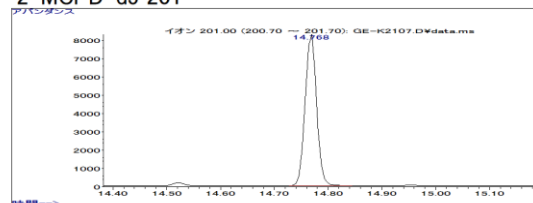
3-MCPD-d5 201



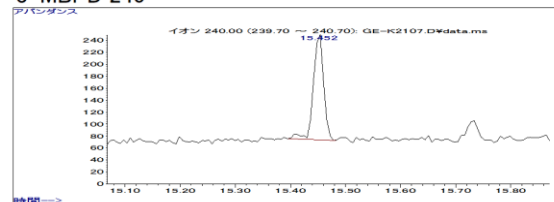
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

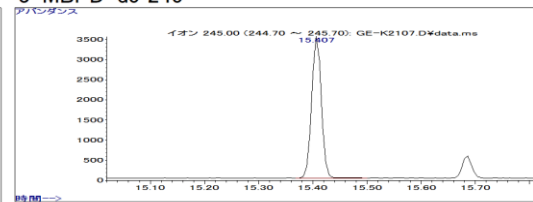


図-13 粉乳③のクロマトグラムの一例