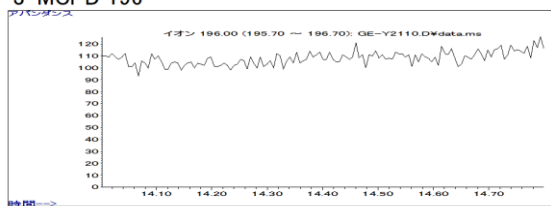
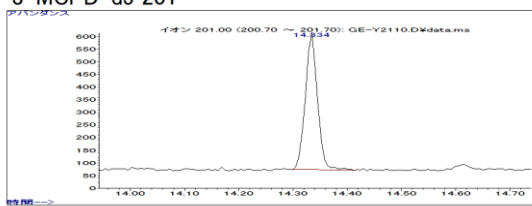


遊離型

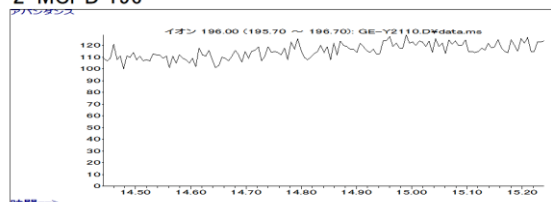
3-MCPD 196



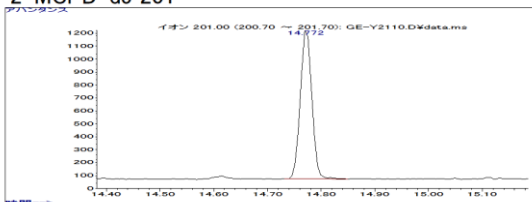
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

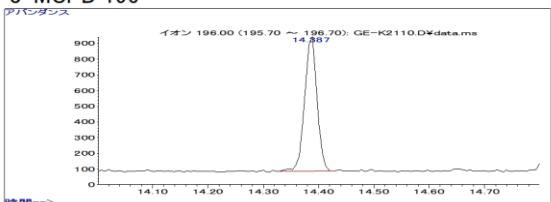


2-MCPD-d5 201

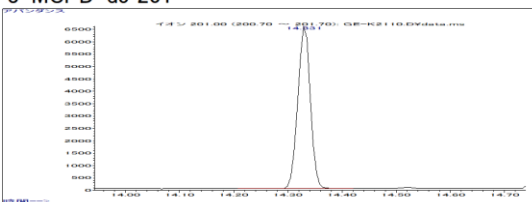


結合型

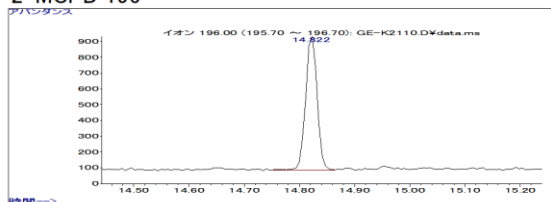
3-MCPD 196



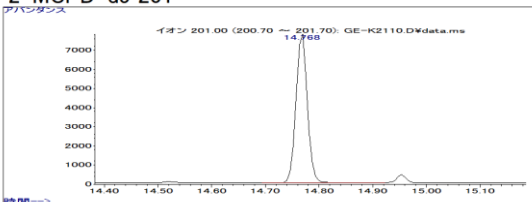
3-MCPD-d5 201



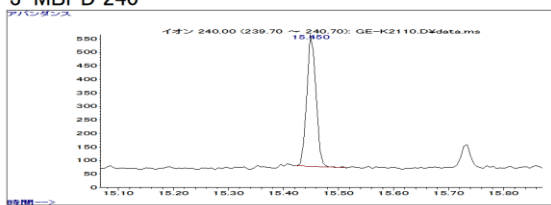
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

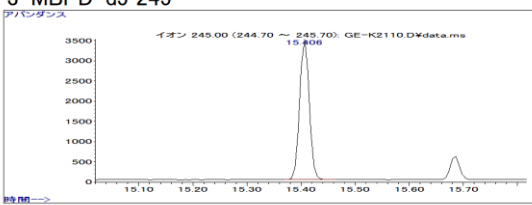
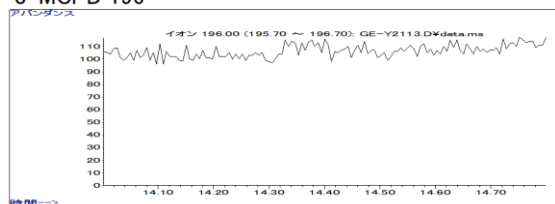


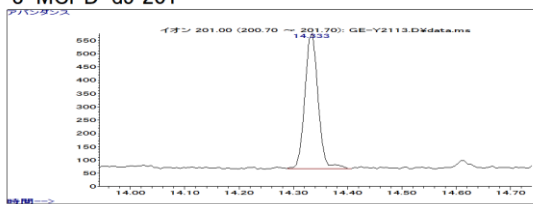
図-14 粉乳④のクロマトグラムの一例

遊離型

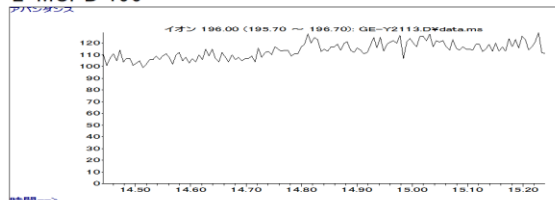
3-MCPD 196



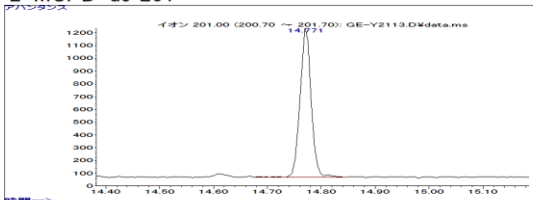
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

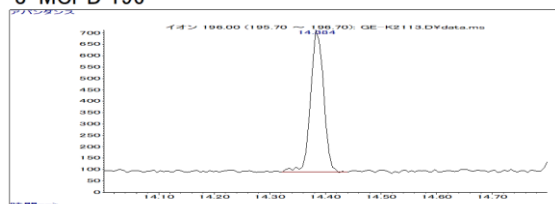


2-MCPD-d5 201

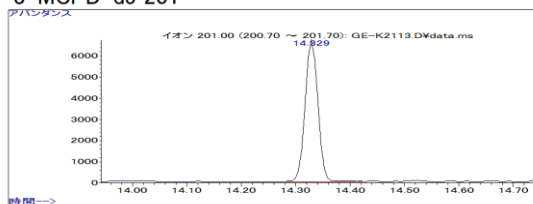


結合型

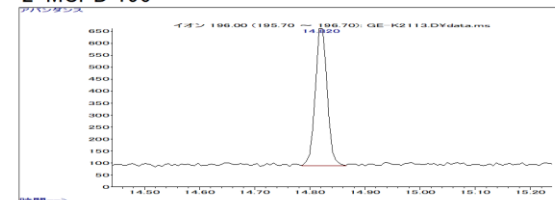
3-MCPD 196



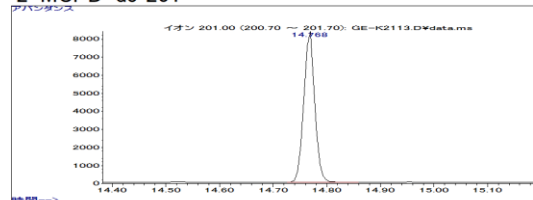
3-MCPD-d5 201



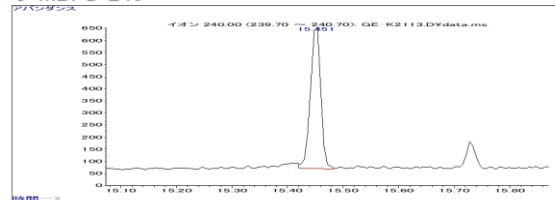
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

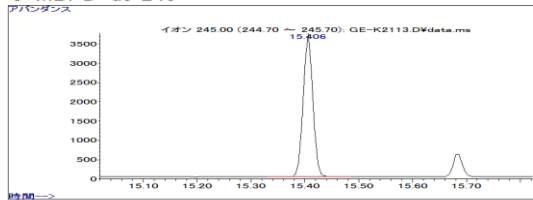
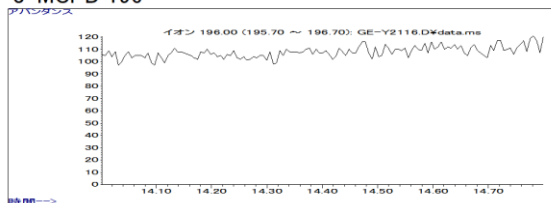


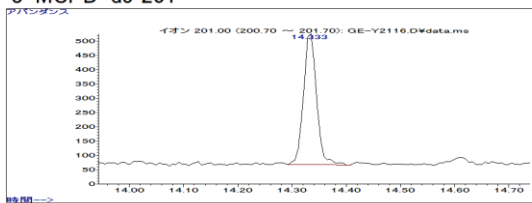
図-15 粉乳⑤のクロマトグラムの一例

遊離型

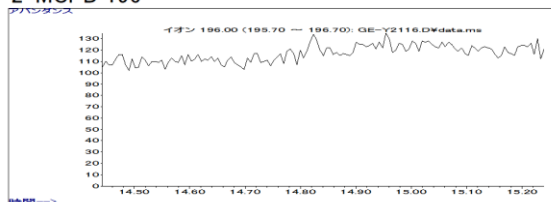
3-MCPD 196



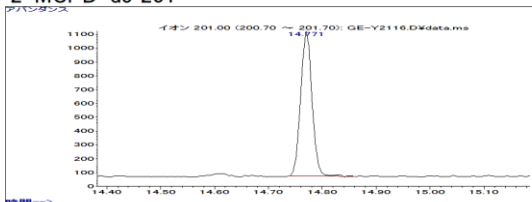
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

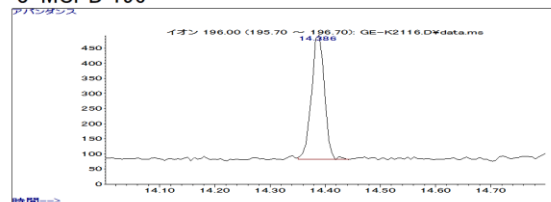


2-MCPD-d5 201

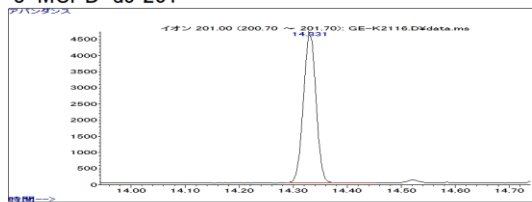


結合型

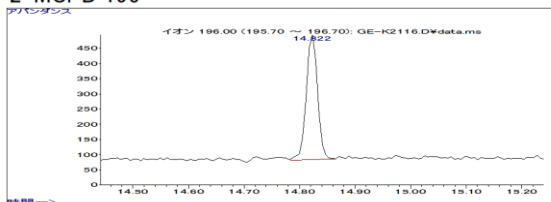
3-MCPD 196



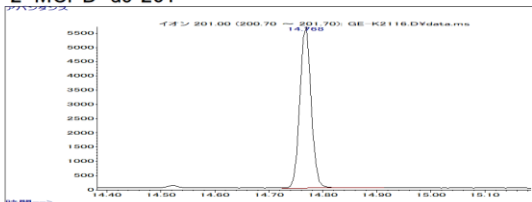
3-MCPD-d5 201



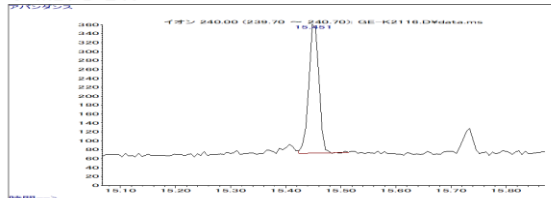
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

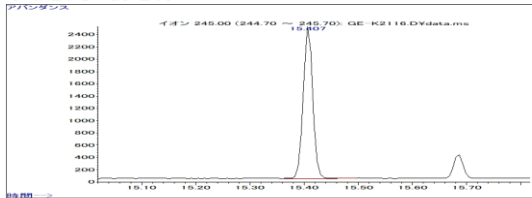


図-16 粉乳⑥のクロマトグラムの一例



写真-1 フリーズドライミルク

試料情報

種類別名称；全粉乳

商品名；北海道miilkoフリーズドライ牛乳

製造者；ふたみ青果株式会社



写真-2 エキストラバージンオリーブオイル

試料情報

種類別名称；有機食用オリーブ油

商品名；アルチェネロ有機エキストラバージンオリーブオイル ドルチェ

原産国；イタリア



写真-3 オリーブオイル

試料情報

商品名；オリーブ油

製造元；富士フイルム和光純薬

(エ) 研究成果の活用における留意点

粉乳の方法についての適用は確認されたが、液状乳の方法については追加で確認が必要である可能性がある。一方、SGS法の原文には「液状乳を凍結乾燥によって粉末に変換し、粉乳に対する抽出法を適用できる」とあるため、液状乳に対しては凍結乾燥を行うことで粉乳の方法を適用することも可能である。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本小課題の目標は達成した。

<引用文献>

1. Zuzana Zelinkova、 Anupam Giri、 Thomas Wenzl. Assessment of critical steps of a GC/MS based indirect analytical method for the determination of fatty acid esters of monochloropropanediols (MCPDEs) and of glycidol (GEs). Food Control、 77、 (2017)、 65-75.

2) 小課題名：単一試験室での妥当性確認

(ア) 研究目標

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(表-50及び表-51)と照合して性能を評価する。

(イ) 研究内容

小課題 1) 実行課題 iii) で入手した不検出疑似対象マトリクスであるフリーズドライミルクを対象試料として、小課題 1 実行課題 iv) にて確立した方法を用いて、試行7、3日間の繰り返し妥当性データを取得する。

(ウ) 研究結果

SGS法(改変)を用いて、フリーズドライミルクを試行7の繰り返し試験を行った結果を表-52に、クロマトグラムの一例を図-17に示した。GEにおける定量下限値は、今回用いたフリーズドライミルクにおいてピークが認められ、その数値が定量下限付近と想定

される濃度レベルであることから、繰り返し試験を実施することで得られた分析結果の標準偏差の10倍、つまり $0.8 \times 10 = 8 \mu\text{g/kg}$ となり、 $10 \mu\text{g/kg}$ が適当と判断した。また、遊離型の3-MCPD及び2-MCPD、結合型の3-MCPDE及び2-MCPDEの定量下限は、GEに比べブランクの影響も小さく、GEでの設定レベルが間違いなく担保できると判断できるため、 $10 \mu\text{g/kg}$ と設定した。設定した定量下限はすべての項目において、AOAC International又はEUの定める定量下限値と比較しても、十分低い数値であった。また、妥当性確認試験の添加濃度については、フリーズドライミルク由来のブランク値の影響を考慮し、EUにおけるGEの基準値相当量である $50 \mu\text{g/kg}$ 及びその2/5相当量である $20 \mu\text{g/kg}$ と設定した。

フリーズドライミルクを用いて上記の濃度での添加回収試験を、標準試料からの繰り返し同日7併行×3日間で行った結果を表-53及び表-54に、クロマトグラムの一例を図-18及び図-19に示した。真度、精度のいずれもAOAC International又はEUの定める性能規準を満たす結果であった（表-55）。

表-50 AOAC Internationalにおける性能規準

分析種	項目	粉乳	液状乳
3-MCPD (結合型及び 遊離型の総量)	真度： 回収率(%)	70-125	
	精度	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 25 (> 100 \mu\text{g/kg})$ $\leq 44 (25-100 \mu\text{g/kg})$	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 44$
	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	≤ 25	≤ 3
2-MCPD (結合型及び 遊離型の総量)	真度： 回収率(%)	70-125	
	精度	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 25 (> 100 \mu\text{g/kg})$ $\leq 44 (25-100 \mu\text{g/kg})$	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 44$
	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	≤ 25	≤ 3
GE (グリシドール 当量)	真度： 回収率(%)	70-125	
	精度	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 25 (> 48 \mu\text{g/kg})$ $\leq 44 (15-48 \mu\text{g/kg})$	$\text{RSD}_r(\%) \leq 22$ $\text{RSD}_R(\%) \leq 44$
	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	≤ 15	≤ 2

表-51 EUにおける性能規準

分析種	項目	粉乳	液状乳
3-MCPD	真度： 回収率(%)	遊離型：75-110 結合型：70-125	
	精度	RSD _r (%) ≤ 15 (RSD _R (%) × 0.66) RSD _R (%) ≤ 22 (修正 Horwitz 式から算出、≤100 μg/kg)	
	LOQ (μg/kg)	遊離型：≤ 14 結合型：≤ 50(基準値×2/5) 脂質<40 %の場合	遊離型：≤ 14 結合型：≤ 6(基準値×2/5) 脂質<40 %の場合
	基準値 (μg/kg) (遊離型＋ 結合型)	125	15
GE (グリシドール 当量)	真度： 回収率(%)	70-125	
	精度	RSD _r (%) ≤ 15 (RSD _R (%) × 0.66) RSD _R (%) ≤ 22 (修正 Horwitz 式から算出、≤100 μg/kg)	
	LOQ (μg/kg)	≤ 20 (基準値×2/5) 脂質<65 %の場合	≤ 2.4 (基準値×2/5) 脂質<8 %の場合
	基準値 (μg/kg)	50	6.0

表-52 フリーズドライミルクの繰り返し試験結果(μg/kg)

試行	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)
2	tr	tr	(5.5)
3	tr	tr	(6.3)
4	tr	tr	(6.3)
5	tr	tr	(6.0)
6	tr	tr	(5.9)
7	tr	tr	(6.7)
平均値	—	—	5.9
標準偏差	—	—	0.8
相対標準偏差(%)	—	—	13.4

定量下限：10 μg/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-53 20 $\mu\text{g/kg}$ 相当量の添加回収試験結果(添加回収率)(単位：%)

試行数		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)
1日目	1	80.5	92.0	115.9	98.5	109.2
	2	80.4	92.3	113.4	96.9	105.7
	3	85.1	92.4	114.4	96.0	105.4
	4	76.8	93.3	115.3	99.3	113.3
	5	79.1	91.6	119.8	101.6	112.7
	6	85.2	92.1	118.4	101.5	114.0
	7	86.1	93.9	113.0	96.5	106.3
2日目	8	84.0	94.3	115.3	96.4	110.0
	9	83.1	95.9	115.4	96.5	105.9
	10	81.9	96.2	114.2	94.3	99.9
	11	80.0	93.9	105.1	95.0	112.5
	12	80.5	93.9	113.5	93.5	102.5
	13	79.5	91.0	113.1	94.1	104.0
	14	77.3	92.8	115.7	92.4	98.6
3日目	15	90.4	97.0	115.1	91.2	95.2
	16	85.0	95.8	113.4	92.9	97.3
	17	87.7	97.4	120.6	91.6	94.1
	18	90.2	93.3	114.8	91.5	100.6
	19	87.1	97.8	113.9	92.5	93.6
	20	81.0	96.9	111.6	91.0	92.2
	21	83.1	97.4	112.6	89.6	97.9
平均値		83.0	94.3	114.5	94.9	103.4
併行精度(%)		3.8	1.5	2.7	1.8	3.9
室内精度(%)		5.0	2.6	2.7	4.1	7.6

表-54 50 $\mu\text{g/kg}$ 相当量の添加回収試験結果(添加回収率)(単位：%)

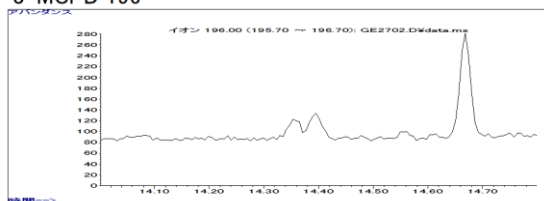
試行数		遊離型		結合型		
		3-MCPD	2-MCPD	3-MCPDE (3-MCPD当量)	2-MCPDE (2-MCPD当量)	GE (グリシドール 当量)
1日目	1	77.8	91.9	117.3	95.8	106.6
	2	78.6	92.5	116.5	95.2	104.5
	3	78.4	90.5	116.0	94.9	100.0
	4	76.8	91.7	115.7	93.8	101.1
	5	78.5	92.4	113.6	93.5	102.9
	6	78.1	92.4	113.2	93.9	104.6
	7	79.3	92.7	116.7	95.0	101.7
2日目	8	83.6	95.7	114.3	94.1	100.3
	9	82.1	96.1	111.1	92.5	98.7
	10	82.8	95.6	114.9	94.1	99.1
	11	85.6	96.2	113.2	91.8	104.8
	12	83.2	94.7	114.3	92.8	98.3
	13	80.2	94.6	114.8	91.6	97.7
	14	79.5	94.5	114.1	92.2	97.6
3日目	15	83.8	98.8	113.8	90.8	96.8
	16	80.5	99.7	111.3	90.3	96.3
	17	84.0	97.0	112.9	92.2	99.0
	18	85.4	98.7	113.4	91.4	93.7
	19	85.2	97.0	112.9	89.8	95.1
	20	84.6	97.5	118.0	91.8	94.2
	21	84.6	99.2	114.0	92.2	95.8
平均値		81.6	95.2	114.4	92.8	99.5
併行精度(%)		2.0	0.9	1.5	1.0	2.2
室内精度(%)		4.1	3.4	1.6	2.0	4.2

表-55 乳児用調製粉乳における妥当性確認結果まとめ

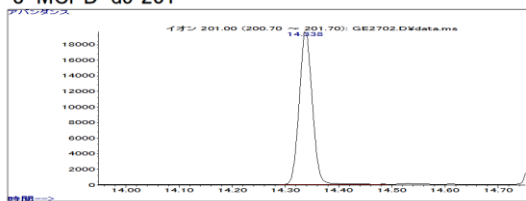
分析種	項目	AOAC International 性能規準	EU 性能規準	SGS 法(改変)
3-MCPD 又は 3-MCPDE (3-MCPD 当量)	真度： 回収率(%)	70-125	遊離型：75-110 結合型：70-125	遊離型：82-83 結合型：114-115
	精度： RSD _r (%)	≤ 22	≤ 15	1.6-5.0
	LOQ (μg/kg)	≤ 25 (遊離型及び 結合型の総量)	遊離型：≤ 14 結合型：≤ 50	10 (遊離型及び結合 型それぞれ)
2-MCPD 又は 2-MCPDE (2-MCPD 当量)	真度： 回収率(%)	70-125	基準なし	遊離型：94-95 結合型：93-95
	精度： RSD _r (%)	≤ 22		2.0-4.1
	LOQ (μg/kg)	≤ 25 (遊離型及び 結合型の総量)		10 (遊離型及び結合 型それぞれ)
GE (グリシドール 当量)	真度： 回収率(%)	70-125	70-125	100-103
	精度： RSD _r (%)	≤ 22	≤ 15	4.2-7.6
	LOQ (μg/kg)	≤ 15	≤ 20	10

結合型

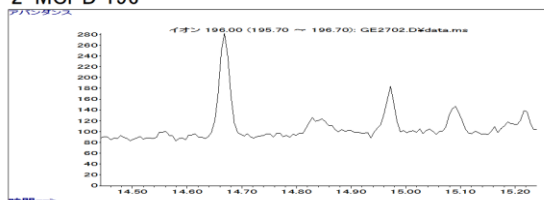
3-MCPD 196



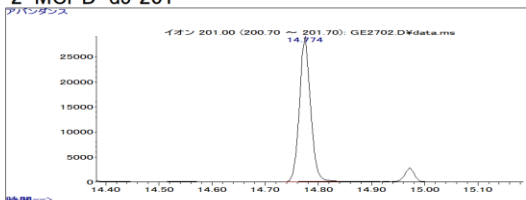
3-MCPD-d5 201



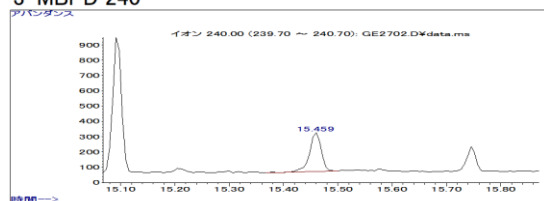
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

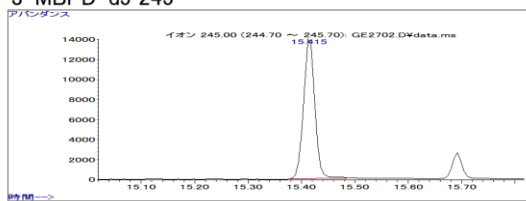
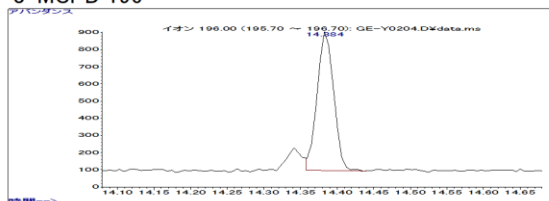


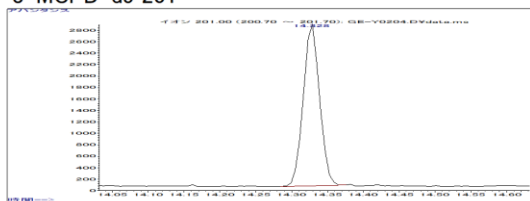
図-17 フリーズドライミルクのクロマトグラムの一例

遊離型

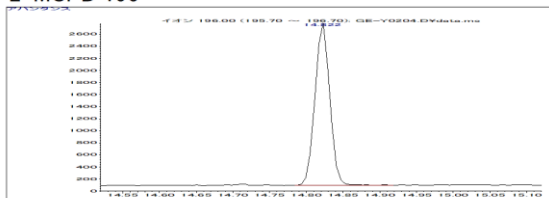
3-MCPD 196



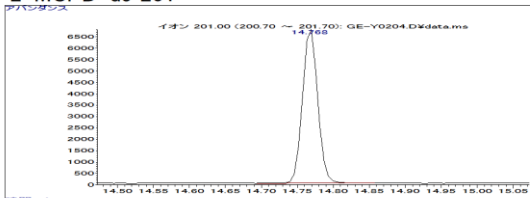
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

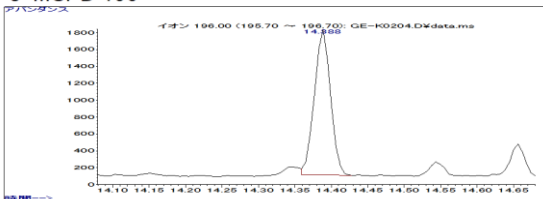


2-MCPD-d5 201

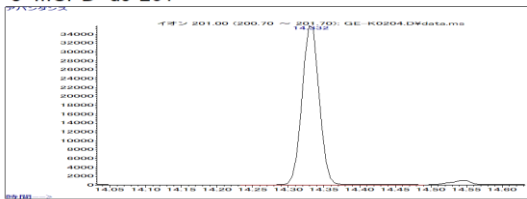


結合型

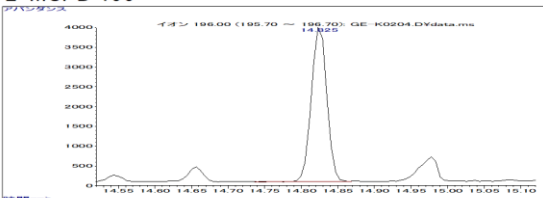
3-MCPD 196



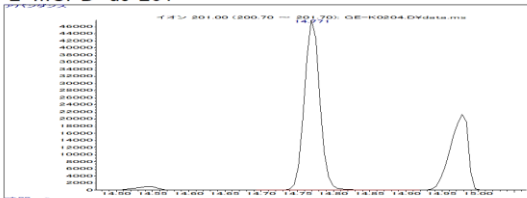
3-MCPD-d5 201



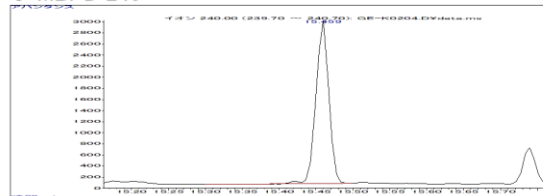
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MBPD 240



3-MBPD-d5 245

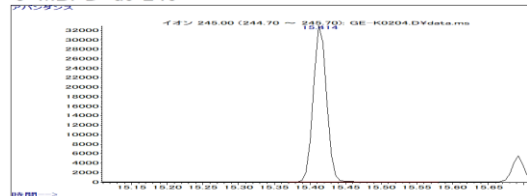
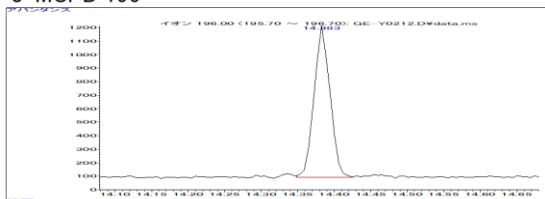


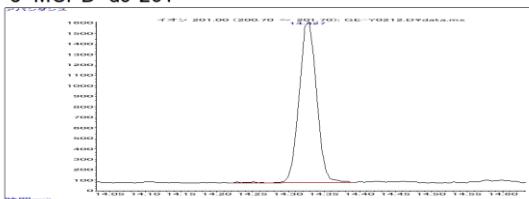
図-18 20 μ g/kg相当量の添加回収試験におけるクロマトグラムの一例

遊離型

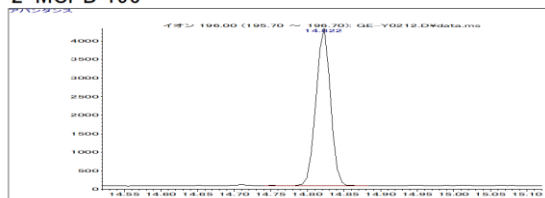
3-MCPD 196



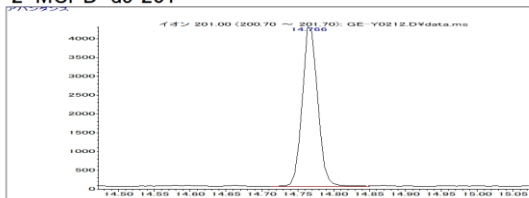
3-MCPD-d5 201



2-MCPD 196

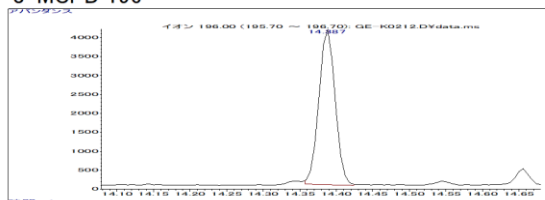


2-MCPD-d5 201

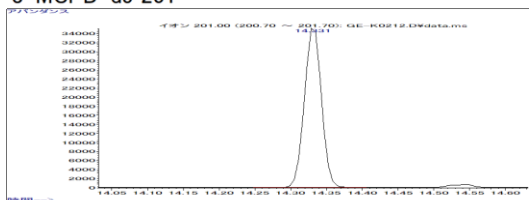


結句型

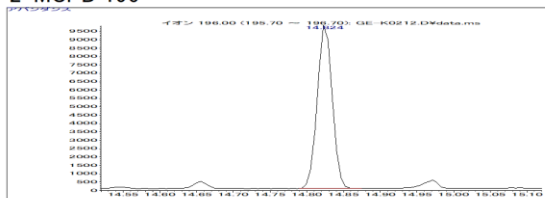
3-MCPD 196



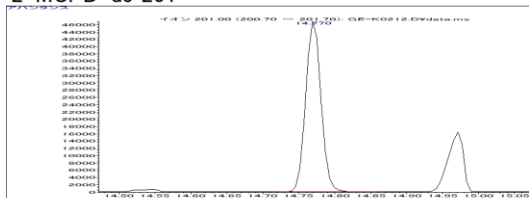
3-MCPD-d5 201



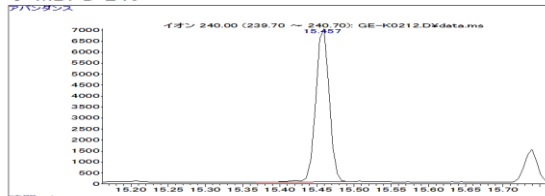
2-MCPD 196



2-MCPD-d5 201



3-MCPD 240



3-MCPD-d5 245

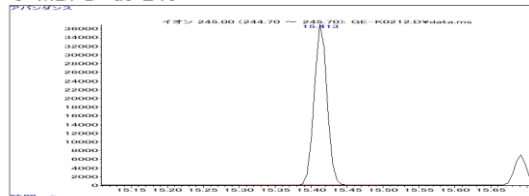


図-19 50 $\mu\text{g/kg}$ 相当量の添加回収試験におけるクロマトグラムの一例

(エ) 研究成果の活用における留意点

フリーズドライミルク中の3-MCPDE及び2-MCPDEについてはピークがほぼ認められていないため、GEでのブランクの結果をもとに、AOAC International又はEUの定める性能規準を満たすよう定量下限の算出を行った。実際の定量下限はもう少し低いところに設定できると考えられるため、将来的な国内製造事業者による一層の低減対策の進展や諸外国におけるより低い濃度への基準値の見直しを見据え、添加濃度をさらに下げての評価が必要となる可能性がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本小課題の目標は達成した。

5 研究成果の発表

別添のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

本課題の目標を達成した。

研究成果一覧

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用しう る成果の 有無	(3)学術論文		(4)学会等発表(口 頭またはポスター)		(5) 出版 図書	(6)国内特許権等		(7)国際特許権等		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
21454605	3	有	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	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推進会 議	2022年02月02日	web開催	29	有	計画の事業概要について説明及び令和3年度事 業の進捗状況の説明及び内容の討議
		2022年10月06日	web開催	27	有	計画の事業概要について説明及び令和4年度事 業の進捗状況の説明及び内容の討議
		2023年03月09日	web開催	26	有	2ヵ年の成果報告及び質疑

(2)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	乳児用調製乳中のクロロプロパノール類の分析 法(SGS改変法)の開発	乳児用調製乳中のクロロプロパノール 類の最新の含有実態を把握し、低減対 策の有効性を検証するための含有実 態調査へ活用	令和5年度に含有実態調査を実施予定

(3)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻 (号)	掲載 ページ
1		該当無し								

(4)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	該当無し					

(5)出版図書

区分:①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1		該当無し					

(6)国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	出願番号	出願 年月日	取得 年月日
1		該当無し						

(7)国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願 年月日	取得 年月日	出願国
1		該当無し							

(8)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載 年月日	備 考
1		該当無し				

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		

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

背景・目的：クロロプロパノール類及びその関連物質は、3-MCPDやそのエステル体である3-MCPD脂肪酸エステル類（3-MCPDE）、グリシドール脂肪酸エステル類（GE）を含み、油脂の精製工程で主に高温加熱した際に意図せず生成する有害化学物質である。そのため、国内のみならず、諸外国においても関心が非常に高く、中でも精製油や精製油を原料として製造する乳児用調製乳中については、3-MCPDE/GEの濃度を低減するための努力継続が国際的に推奨されており、わが国の関係製造事業者も、食品中の3-MCPDE/GEの低減に努めている。

こうした製造事業者による低減対策の有効性の検証が必要であるが、日本国内において、これら関連物質の基準値設定がなく、また乳児用調製乳中のこれらの物質を十分に低い濃度範囲で精確に定量することが可能な分析法も整備されていない。

そこで、本研究では、AOAC Internationalの合同試験の候補となっている2つの分析法を軸に、乳児用調製粉乳中のこれらの物質の分析法の確立を行い、その分析法をAOAC International 又はEUの定める性能規準と照合して性能評価を行うこととした。

AOAC Internationalの合同試験法

- ①Kuhlmann 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 ⇒ **以下、SGS法**
- ②Dubois 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 ⇒ **以下、ネスレ法**

両試験法の検証結果

- SGS法**
- 試料導入部(注入口)にProgrammable Temperature Vaporizer (PTV) 装置を使用。
⇒ **より汎用性の高いスプリット/スプリットレス注入法に代替することが可能。**
 - 注入口の温度条件によりGEの二次的生成。⇒ **注入口の温度は135℃とすることで回避**
- ネスレ法**
- 試料抽出時の高速振とう機の汎用性が低い。
 - GC-MS/MS使用を想定した測定感度の試験設計。⇒ **ハード面での制限が大きい。**
 - 試験工程に3-MCPDE/GE未含有のブランクオイルが必要。
⇒ **調達が困難、使用しない方法の検討が必要。**

SGS法を一部変更した方法の検討・開発

研究成果①SGS法（改変）の開発

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℃**
カラム 85℃(0.5 min保持)→6℃/min昇温→150℃→12℃/min昇温→180℃→25℃/min昇温→280℃(8 min保持)
イオン化法及びイオン源温度: EI, 230℃
ガス流量: ヘリウム 1.0 mL/min
パージ流量: 50 mL/min、1分
注入量: **1 μ L**

研究成果②乳児用調製粉乳におけるSGS法(改変)を用いた妥当性確認(7併行、3日間の添加回収試験)結果とAOAC International 又はEUの定める性能規準

分析種	項目	AOAC International規準	EU 規準	SGS法(改変)
3-MCPD又は3-MCPDE (3-MCPD当量)	真度: 回収率(%)	70-125	遊離型: 75-110 結合型: 70-125	遊離型: 82-83 結合型: 114-115
	精度: RSD _r (%)	≤ 22	≤ 15	1.6-5.0
	LOQ (μg/kg)	≤ 25 (遊離型及び結合型の総量)	遊離型: ≤ 14 結合型: ≤ 50	10 (遊離型及び結合型それぞれ)
2-MCPD又は2-MCPDE (2-MCPD当量)	真度: 回収率(%)	70-125	基準なし	遊離型: 94-95 結合型: 93-95
	精度: RSD _r (%)	≤ 22		2.0-4.1
	LOQ (μg/kg)	≤ 25 (遊離型及び結合型の総量)		10 (遊離型及び結合型それぞれ)
GE (グリシドール当量)	真度: 回収率(%)	70-125	70-125	100-103
	精度: RSD _r (%)	≤ 22	≤ 15	4.2-7.6
	LOQ (μg/kg)	≤ 15	≤ 20	10

まとめ

AOAC Internationalの合同試験候補の一つであるSGS法について、GEの二次的生成が確認されたため、注入条件(注入温度)を最適化した。確立した方法「SGS法(改変)」は妥当性確認を実施した結果、AOAC International 又はEUの定める性能規準を十分に満たしており、乳児用調製粉乳中の3-MCPDE 及びGE が十分に低い濃度範囲で精確に定量することができる分析法であると確認された。

研究機関: 一般財団法人日本食品分析センター
研究総括者: 水越 一史