

食品中のMCPDとグリシジルエステルの測定

Tobias Uber, Marco Nestola ● Axel Semrau GmbH, 45549 Sprockhövel, Germany

キーワード

3-モノクロロプロパン-1,2-ジオール、3-MCPD、2-モノクロロプロパン-1,3-ジオール、2-MCPD、グリシドール、脂肪、油、GC-MS、AOCS Cd 29c-13



FOOD SAFETY

概要

- PAL制御用CHRONOSソフトウェアとPAL DHRデュアルヘッドシステムの組み合わせにより非常に効率的な自動化を実現。
1試料あたり45分で分析可能
- AOCS^{※1} Cd 29c-13^{※2} (または DGF C-VI 18 (10)) が最適な手法である
- クリーンテクノロジーはシステムの優れた堅牢性を提供する

序文

3-モノクロロプロパン-1,2-ジオール(3-MCPD)、2-モノクロロプロパン-1,3-ジオール(2-MCPD)及びグリシドールは、食品中の夾雑物質として知られています。MCPD脂肪酸エステルは、高温または塩を含む塩素の存在下で油や脂肪の精製工程中に生ずることがあります。しかし、その精製工程は食品中に含まれる不要な匂い物質や風味物質もしくは微量の毒性化合物(農薬、重金属、またはマイコトキシン)を取り除くために不可欠です。MCPD脂肪酸エステルの分析は発がん性の疑いから重要性を増しており、動物実験では遊離3-MCPDの摂取が、がんのリスクを高めることが明らかになりました。2018年11月現在、3-MCPDの耐容一日摂取量(TDI)を欧州食品安全機関(EFSA)では体重1 kgあたり2.0 µg、FAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)では体重1 kgあたり4.0 µgとしています。

MCPD脂肪酸エステルの測定にはいくつもの手法があり(文献参照)これらの手法はLC-MS/MSを用いた直接測定または、GC-MSを用いた間接測定の2つのグループに分けられます。直接分析は、個々のMCPD脂肪酸エステルをLC/MSで測定するためにより時間がかかります。従って一般的には間接分析がより頻繁に用いられますが、どちらの場合でも手動の試料調製には手間がかかりエラーを起こしやすい工程です。そこでドイツのVARパートナーであるAxel Semrau[®]は、現行の手法に則ったPAL DHRデュアルヘッドによる自動試料調製法を開発しました。

PAL DHR デュアルヘッドによる自動化ワークフロー

PAL DHRデュアルヘッドによる自動化には最も効率的な手法であるAOCS Cd 29c-13またはDGF^{※3} C-VI 18(10)を選択しました。「蒸発工程」は正確な測定には不要のため省略し、代わりに独自技術であるClean-Technologyを追加しました。このワークフローでは、脂肪酸エステルと結合した分析対象物質が先ずエステル交換反応で遊離状態に変換されます。DGF法ではグリシドールの定量に2つのパートが必要です。**【パートA】**でのエステル交換反応は塩化ナトリウム(NaCl)の添加により停止します。このパートではMCPD脂肪酸エステルとグリシジルエステルは共に遊離したMCPDに変換されます。**【パートB】**では、エステル交換反応は臭化ナトリウム溶液(NaBr)の添加により停止します。この場合MCPD脂肪酸エステルのみが遊離MCPDに変換されます。次の段階で遊離したMCPDを抽出し誘導体化を行います。その後、洗浄段階を経てGC-MS/MSによる測定が行われます。**【パートA】**と**【パートB】**の測定値の差に実験的に決定された変換係数(t)を掛けて算出された数値が食品試料中のグリシドール量となります(図1)。この新システムでは1試料あたり、わずか45分で分析可能(パートAとB)となり、最高の精度と大幅な時間節約を実現しました。

様々なモジュールの組み合わせができるPAL3は、種々の試料調製の自動化に非常に適しています。例えばSGS(Kuhlmann, AOCS Cd 29b-13)による3-in-1手法は、短い手動の操作が必要ですが部分的に自動化することができます。PALシステムに遠心分離機を組み込めば、Unilever法(AOCS Cd 29a-13)の自動化も可能です。また、Zwagerman-Overman法や従来のWeisshaar法はPALシステムにより自動化されています。

※1 AOCS=The American Oil Chemists' Society

※2 AOCS公式法の一つ。GC/MSによる食品油脂中の2-クロロプロパン-1,3-ジオール(2-MCPD)、3-クロロプロパン-1,2-ジオール(3-MCPD)およびグリシドールの脂肪酸エステルの測定に用いられる

※3 DGF=ドイツ油脂学会(DGF法はDGFの公式法のこと)



図1 従来のDGF法とDGF Fast & CleanによるMCPDの間接分析のための試料調製のワークフロー

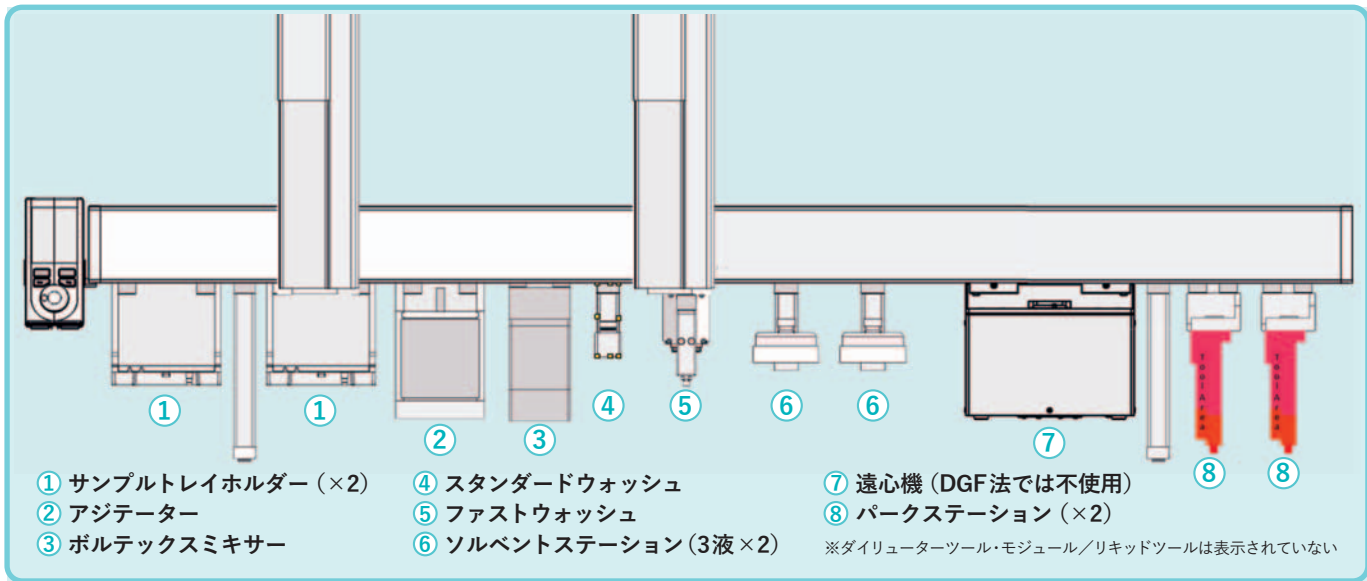


図2 PAL DHRの設定

装置の構成

- PAL DHR デュアルヘッドシステム (RTC/RSIヘッド, Xレール1600mm)
- CHRONOSソフトウェア
- Bruker EVOQTM GC-TQと456-GC (機器パラメータは表1を参照)

1600mmX軸のPAL DHRは必要なすべてのモジュールが搭載可能です。PALシステムはプラットフォームの考えに基づくため他の手法やアプリケーションにも応用できます。このアプリケーションでは、ダイリ्यूターモジュールは3つの溶媒(n-ヘキサン、抽出剤、イソオクタン)を供給します。分析カラムやMSイオン源での誘導体化試薬(フェニルボロン酸)の凝縮を避けるため、バックフラッシュオプションを装備したGCシステムを用います。これにより装置の汚染が軽減されます。GC-MSは最低200回以上の連続注入が可能となるため稼働時間は長くなり、安定したデータを得ることができました(図3)。さらにこのシステムはBruker社以外のメーカーの装置、または既に保有されているGC-MS装置でも設置可能です。システム全体はユーザーフレンドリーなCHRONOSソフトウェアで制御されており、複雑な手順も容易に操作できます。Axel Semrau®社のCHRONECTアプリケーションソリューションはアプリケーションラボでプリインストールされてテストが行われます(工場許容テスト)。システムはその後、すぐに使用できる状態でお客様に届けられ、お客様先で動作確認を行います(実地許容テスト)。

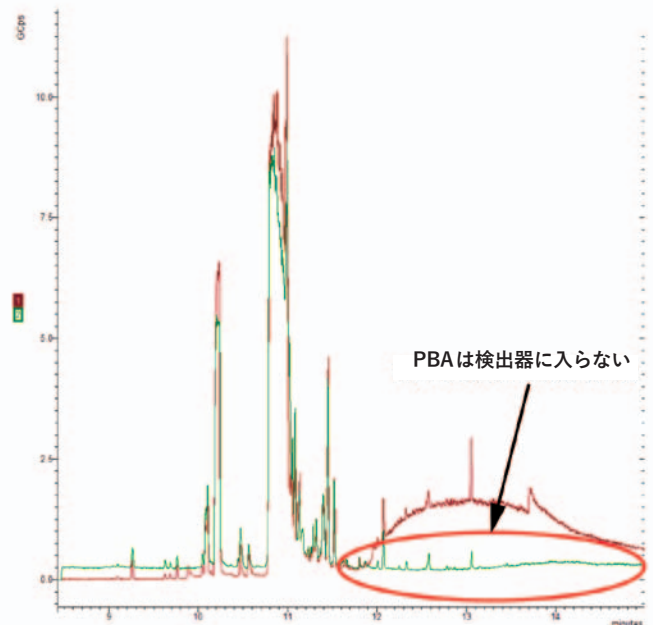


図3 Clean-Technologyあり(緑)となし(赤)のフルスキャンのTIC。注入試料からのPBA除去によりGC-MSのメンテナンスによるダウンタイムを大幅に削減

結果

3-MCPDと2-MCPD及びそれに付随する重水素化されたバリエーションが、トリプル四重極型質量分析計で検出されました。測定には、各化合物について1つの定性イオンと定量イオンを選択し、プリカーサーイオンの断片化のため最適なコリジョンエネルギーは実験により決定しました。

GC-MS装置の主要な測定条件は表1の通りです。

表1 3-MCPDと2-MCPD検出のためのGC-MSのパラメータ

インジェクション		SSL, 250 °C; 注入容量1 µL, スプリットレス(1分後に1:30にスプリット)		
温度 GC (°C)	加熱速度 (°C/分)	保持時間 (分)	合計 (分)	
85.0		0.10	0.10	
200.0	200.0	1.00	1.68	
300.0	200.0	10.00	12.18	
圧力制御	1.5 mL/分の一定流量、2分後にバックフラッシュ			
GCカラム	Rxi-5 MS、内径0.25 mm、0.25 µm フィルム			
オープンプログラム				
温度 GC (°C)	加熱速度 (°C/分)	保持時間 (分)	合計 (分)	
80.0		1.00	1.00	
150.0	10.0	0.00	8.00	
320.0	30.0	10.00	23.67	
GC-MS		トランスファーライン280 °C、CIDガス アルゴン、MRMモード		
化合物	保持時間 (分)	プリカーサーイオン	プロダクトイオン	モード
2-MCPD	7.71	198.00	104.00	定量イオン
		196.00	104.00	定性イオン
2-MCPD-d5	7.66	203.00	107.00	定量イオン
		201.00	93.00	定性イオン
3-MCPD	7.36	196.00	147.00	定量イオン
		196.00	91.00	定性イオン
3-MCPD-d5	7.32	201.00	150.00	定量イオン
		201.00	93.00	定性イオン

まず従来のDGF法について検証しました。試料はDGFガイドラインに沿って調製し分析を行いました。検証には、rac-1,2-bis-パルミトイル-3-クロロプロパンジオールとrac-1,3-ジステアロイル-2-クロロプロパンジオールを用いました。これらの化合物の特定量を天然オリブオイルに加え、PAL DHRシステムで調製を行いました。天然オリブオイルは低温で圧搾されるためMCPDエステルを含みません。そのため、ブランクマトリックスとして適切です。コントロール測定において、3-MCPDと2-MCPDのブランク値は、試料1 kgあたり～ 0.02 mgという値を確認しました。

検証実験の結果を表2に示します。この測定結果から、3-MCPDの試料1 kgあたりの検出限界は0.026 mg (S/N=3)、試料1 kgあたりの定量限界は0.041 mg (S/N=10)という結果が得られました。同様の手順で、DGF Fast & Clean法についても検証を行いました。ここでは3-MCPDと2-MCPDの含有量が並行試験で明らかとなっているリファレンス油 (FAPAS T2646QC) も追加で測定しました。

表2 従来のDGF法と、DGF Fast & Clean法により、パートAとパートBの4日間連続測定で得られた回収率 (RC, %単位)と再現性 (RP, % SD単位) の値

	従来のDGF		DGF Fast & Clean	
	回収率 (%)	再現性 (% SD)	回収率 (%)	再現性 (% SD)
3-MCPD パートA	102.6	3.9	91.6	7.7
3-MCPD パートB	94.3	3.9	101.9	8.8
2-MCPD パートB	133.2	6.0	116.2	8.9

表3 手動による試料調製、従来のDGF法、DGF Fast&Clean法の各結果の比較

サンプル	測定	3-MCPD (mg/kg)	2-MCPD (mg/kg)	グリシドール (mg/kg)
リファレンス油 (FAPAS T2646QC)	手動による試料調製	0.59	0.31	0.26
	従来のDGF法	0.49	0.30	0.23
	DGF Fast&Clean法	0.50	0.38	0.36
食用油 (未知試料)	手動による試料調製	0.78	0.39	0.64
	DGF Fast&Clean法	0.80	0.58	0.73
菜種油	手動による試料調製	0.14	<0.10	0.10
	DGF Fast&Clean法	0.11	0.08	0.13
高リノール酸ヒマワリ油	手動による試料調製	0.84	0.39	0.15
	DGF Fast&Clean法	0.73	0.60	0.29
高オレイン酸ヒマワリ油	手動による試料調製	0.31	0.15	0.49
	DGF Fast&Clean法	0.25	0.19	0.58

結果の考察

標準的な手順で各メソッドの検証を行い、回収率と再現性を求めました。なお、データは4日間連続で取得しています。従来のDGF法を用いると、回収率は102.6～ 133.2%でした (表2)。また、DGF Fast & Clean法では91～ 116%の回収率が得られ、2-MCPDの回収率も100%以上でした。

表4では、従来のDGF法、DGF Fast & Clean、及びSGS 3-in-1の優れた比較可能性が強調されています。DGF Fast & Clean法は、表7に示すように1試料あたり45分間で結果を取得することができます。この方法では、試料の重複処理により、24時間で36試料の分析を行うことができるため、特に従来のDGF法と比べ大幅な時間の節約になります。

表4 手動のDGF法とSGS 3-in-1法と比較した、ヒマワリ油と菜種油の混合物のDGF Fast & Clean法での分析結果

	脂肪混合1		脂肪混合物2	
	3-MCPDエステル (mg/kg)	グリシジルエステル (mg/kg)	3-MCPDエステル (mg/kg)	グリシジルエステル (mg/kg)
“DGF Fast & Clean” DGF C-VI 18, AOCS Cd 29c-13	0.14	0.05	0.11	<0.05
DGF “手動DGF法” C-VI 18, AOCS Cd 29c-13	0.15	0.08	0.13	0.05
“SGS 3-in 1法” 手動AOCS Cd 29b-13	0.14	<0.05	0.10	<0.05

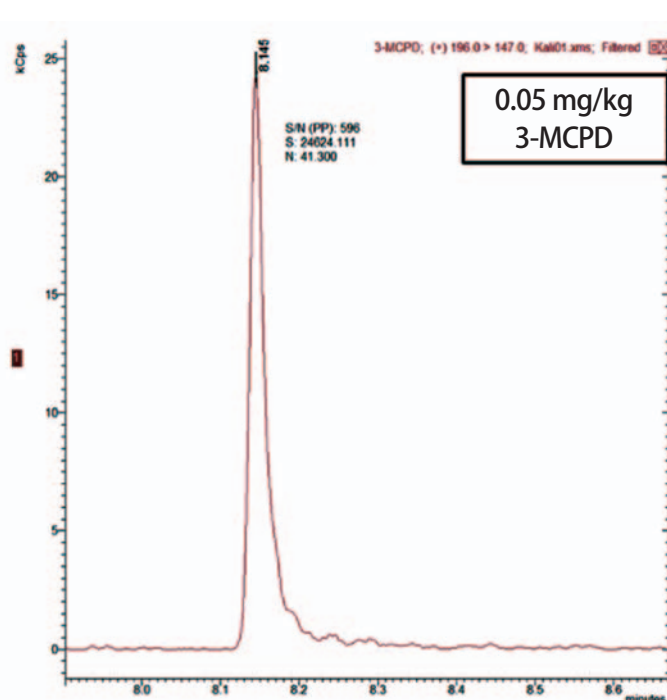


図4 オリーブ油中0.05 mg / kgの3-MCPDのクロマトグラム

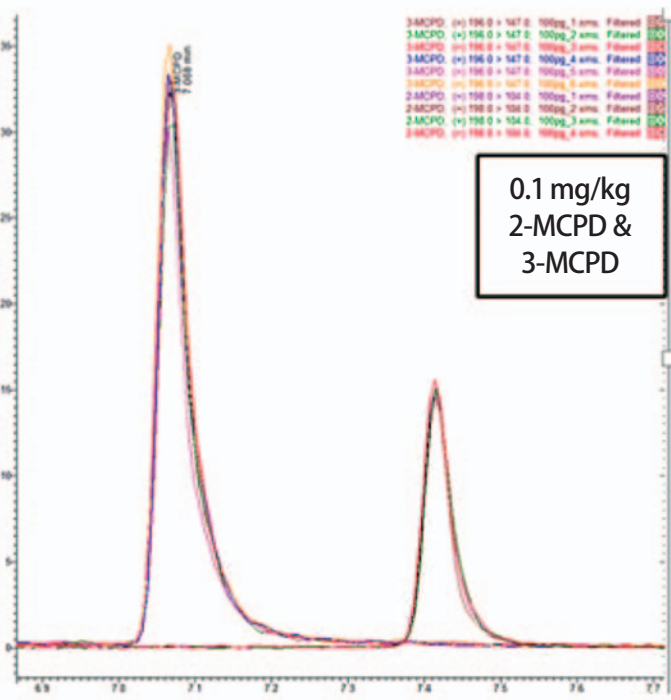


図5 異なる濃度の2-MCPDおよび3-MCPDの自動測定結果連続10回測定したクロマトグラムを重ねあわせても優れた再現性

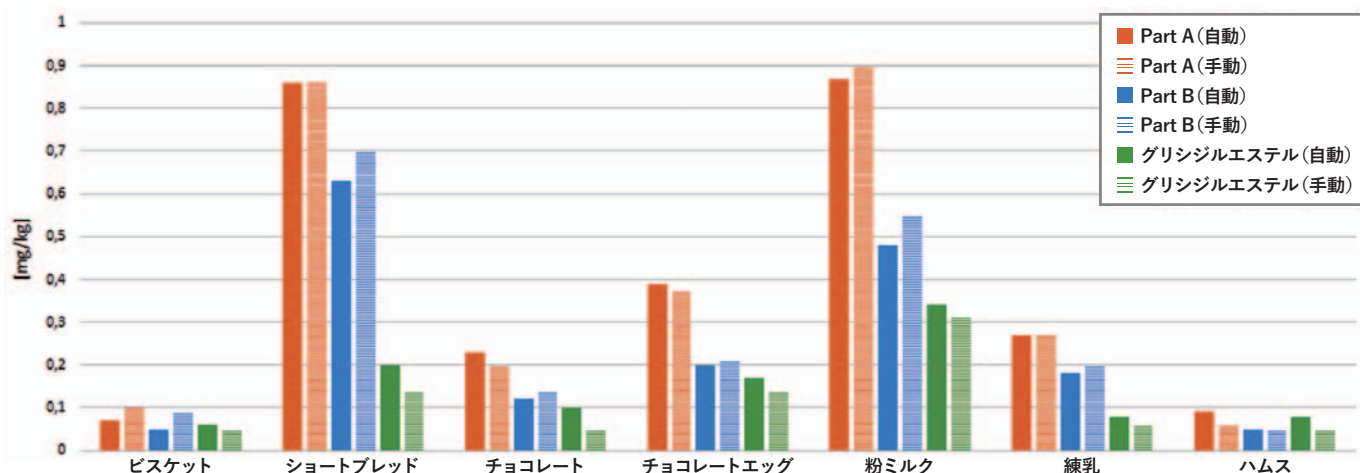


図6 いくつかの食品内の2-MCPDと3-MCPD及びグリシドールの含有量測定結果

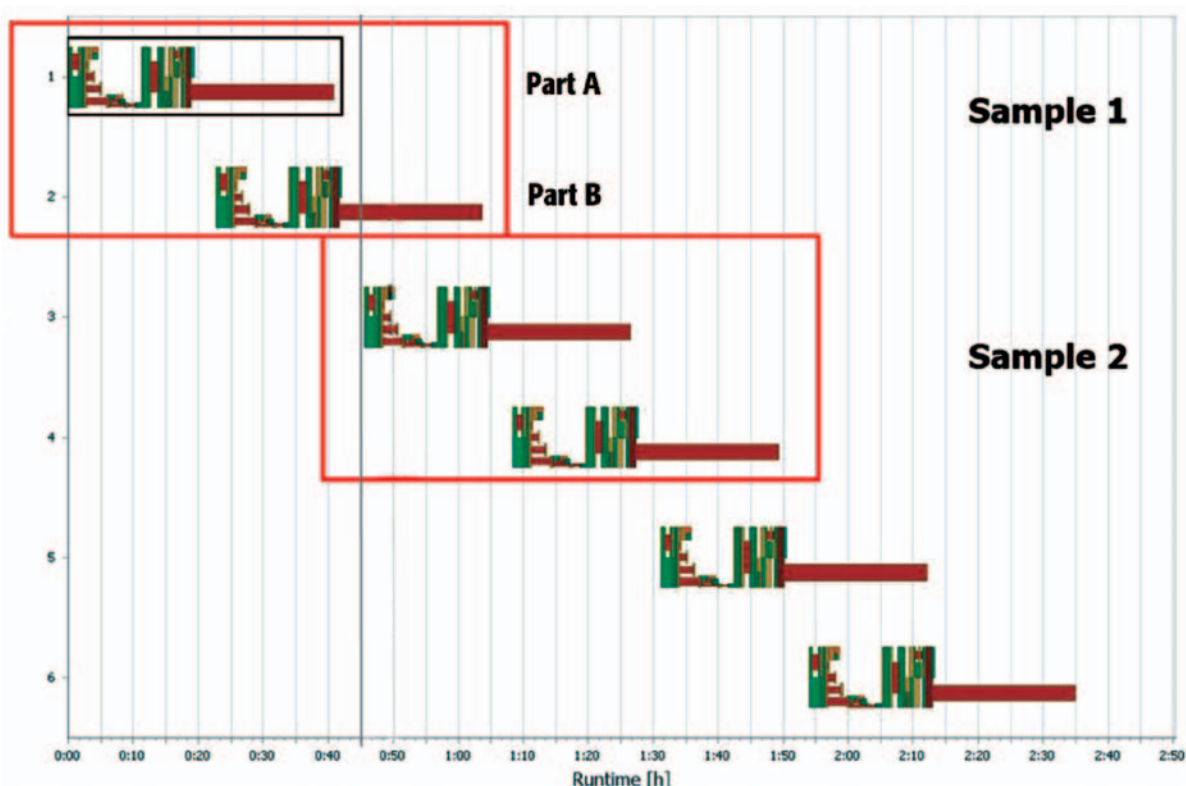


図7 CHRONOSのオーバーラップ機能により45分間に1つの試料のパートAおよびパートBが組み合わされた分析が可能になり、生産性を向上させる

まとめ

- MCPDとグリシドールの分析のための試料調製の自動化は、スループットと再現性を向上させる
- この方法では、試料を短時間で調製・分析できることを検証（パートAとBの両方で45分）。
よってAxel Semrau®はAOCS Cd 29c-13（またはDGF C-VI 18(10)）を最も効率的な手法として推奨する
- PAL DHR デュアルヘッドシステムは、2つのヘッドが独立した作業を並列に行うことができるため、工程の大幅な効率化を実現。CHRONOSは、機器リソースの最も効率的な割り当てを計算することによりスループットを最適化した
- GC-MSのためのClean-Technologyはシステムの優れた堅牢性を提供する
- 完全自動化された本アプリケーションは、食品管理ラボでの2-および3-MCPDならびにグリシドールのルーチン分析に適している

References

Zwagerman R, Overman P; A novel method for the automatic sample preparation and analysis of 3-MCPD-, 2-MCPD-, and glycidylesters in edible oils and fats. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2016, 118, 997–1006.
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), Official AOCS methods, AOCS 29c-13, approved 2013.
Determination of Bound Monochloropropanediol-(MCPD-) and Bound 2,3-Epoxy-1-Propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS), Official AOCS Methods, AOCS 29b-13, approved 2013.
2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification, Official AOCS Methods, AOCS 29a-13, approved 2013.
Kuhlman, J., Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011, 113, 335–344.



エーエムアール株式会社

〒152-0031 東京都目黒区中根2-13-18
Tel 03-5731-2281/Fax 03-5731-2283



<http://www.amr-inc.co.jp/>

エーエムアール

