

乳児用調製粉乳中の多環芳香族炭化水素の抽出と分析

水素をキャリアガスに使用した GC/MS と Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによる分析

著者

Jessica Westland and
Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳から多環芳香族炭化水素（PAH）を抽出およびクリーンアップするためのサンプル前処理メソッドについて説明します。Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid（EMR-Lipid）を使用すると、乳児用調製粉乳から高度に選択的かつ効率的に脂質を除去し、良好な回収率で分析種を回収できます。また、前処理後の溶媒をイソオクタンへ交換することにより、GC/MS に注入可能になります。このアプリケーションノートでは、水素キャリアガス用の Agilent HydroInert イオン源¹も紹介しています。

はじめに

人間が PAH に曝露される経路として一般的なものの 1 つに、食品の摂取があります。いくつかの国では、食品および食品生産物・飲料中の PAH の許容限度が設定され、さらに最も重要な化合物の監視戦略を実施するための法律が立案されています。²さらに世界保健機関 (WHO) や欧州委員会 (EC) などの規制機関は、特にその生成を誘発するプロセスを管理する戦略により、食品中の PAH 濃度を下げするための規制を開始しました。²

その中で、乳児用調製粉乳中の PAH の濃度が懸念されています。EC は、乳児を「生後 12 か月未満の子供」と定義し、乳児用調製粉乳を「生後数か月の間に乳児が使用し、適切な補完食が導入されるまで、そのような乳児の栄養要件を単独で満たす食品」と定義しています。³現行の欧州の法律では、乳幼児向けの穀物ベースの加工食品と離乳食 (乳児用調製粉乳およびフォローオン調製乳) に関する具体的な PAH パラメータが規定されています。⁴欧州委員会規則 (EU) 番号 835/2011 によると、乳幼児向けの穀物ベースの加工食品および離乳食に含まれるベンゾ[a]ピレン (BaP) と PAH4 (BaP、ベンゾ[a]アントラセン (BaA)、ベンゾ[b]フルオランテン (BbF)、クリセン (Chr) の合計) の含有量は、1 µg/kg を超えてはなりません。

Captiva EMR-Lipid パススルークリーンアップは上市して以来、大きな注目を集めています。EMR-Lipid 充填剤は、脂質の枝分かれのない炭化水素鎖に選択的に作用するため、その後の分析用に“かさ高い”分析種を溶媒内に残すことができます。この充填剤はその選択的な機構のため、脂肪の多い食品マトリックス中の複数種類の多成分残留分析に最適です。

また、市場で世界的なヘリウム (He) 危機が広がるにつれて、研究機関はヘリウムに代わる、より持続可能な手段を探しており、H₂ キャリアガスというオプションの可能性を模索しています。GC 用の H₂ キャリアガスの経済的利点は広く知られていますが、結果として MS イオン源で水素化および二塩素化反応が起こる可能性があるため、GC/MS および GC/MS/MS に H₂ を適用することには課題があります。Agilent HydroInert イオン源は、GC/MSD 用に新しく設計されたエクストラクタイオン源であり、これらの問題に対処し、GC/MS での H₂ キャリアガスの性能を向上させます。¹

本検討では、サンプル前処理に Captiva EMR-Lipid パススルークリーンアップを使用し、続いて HydroInert イオン源と H₂ キャリアガスを使用した GC/MS による乳児用調製粉乳中の PAH の分析について調査します。

実験方法

サンプル前処理

サンプル前処理メソッド開発は、以前に公開された牛肉とサーモンに使用された PAH メソッドに従いました。⁵ 溶媒抽出の前に、乳児用調製粉乳を水に溶解する必要があります。次に粗抽出物を、Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジを使用してクリーンアップします。GC/MS で PAH を分析するために、クリーンアップした抽出物をイソオクタン (より GC に適した溶媒) で抽出しました。図 1 にサンプル前処理手順を示します。サンプル前処理手順全体で、乳児用調製粉乳サンプルを 5 倍に希釈しました。

機器による分析

PAH の定量は、GC/MS を使用して行えます。GC/MS により、分析種とそれぞれの内部標準を高い選択性で正確に同定できるため、分析エラーが減少します。²乳児用調製粉乳の PAH 分析は、5977C GC/MSD と組み合わせた 8890 GC で H₂ キャリアガスと HydroInert イオン源を使用して実施しました (図 2)。

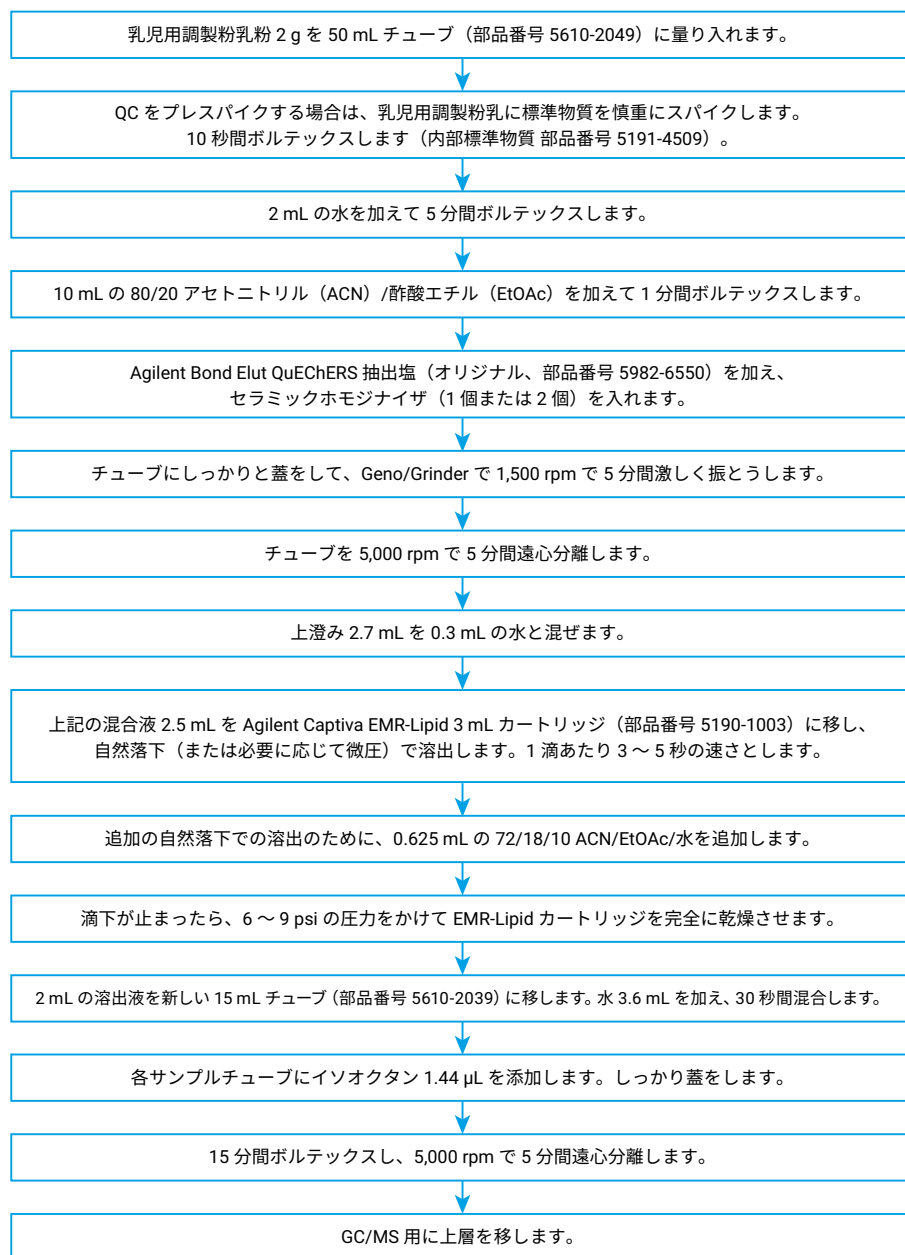


図 1. 乳児用調製粉乳のサンプル前処理手順表

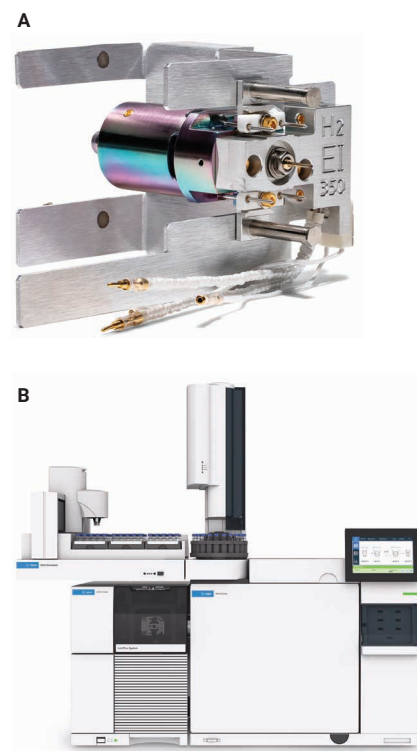


図 2. Agilent HydroInert イオン源 (A) と Agilent 8890 GC および 5977C GC/MSD システム (B)

8890 GC システムは、Agilent J & W DB-EUPAH GC カラム（部品番号 121-9627）と HydroInert イオン源を備えた Agilent 5977C Inert Plus GC/MSD を組み合わせて構成しました。表 1 と 2 に、本検討で使用した GC/MS 機器および消耗品をまとめます。

結果と考察

サンプル前処理

低い規制値と食品マトリックスにより、PAH の分析はさらに複雑になります。その結果、長時間の多段階サンプル前処理法が必要です。溶解度・温度・イオン強度・元のマトリックスとの相互作用など、複数の要因が PAH の定量に影響を与える可能性があります。PAH は疎水性の高い化合物であり、特に環が 3 つまたは 4 つのヘビー PAH は、通常 5 を超える高い log P 値を示します。そのため、脂質含有量の高いマトリックスやその他の非極性成分を含むマトリックスに容易に蓄積されます。⁶したがって食品マトリックスにはそれぞれ、その組成に応じた特定のサンプル前処理法があります。このようにPAH 分析の適切な手順を決定するには、目的のマトリックスに関する詳細な知識が不可欠です。⁷

乳児用調製粉乳は、脂肪を 5 ～ 20 % 含む比較的脂肪の多い食物マトリックスです。乾燥粉末は、溶媒抽出の前に水に溶解する必要があります。乳児用調製粉乳マトリックスからの溶媒抽出後、目的の分析成分を分離し、潜在的な干渉、特にトリグリセリドや脂肪酸などの脂肪共抽出物を除去するために、クリーンアップ/精製ステップが不可欠です。ここでは Captiva EMR-Lipid を用いて、効率的なマトリックスクリーンアップが行えます。²

表 1. GC および MSD 機器および消耗品

部品	説明
GC	Agilent 8890 GC システム
MS	Agilent 5977C Inert Plus GC/MSD
イオン源	Agilent HydroInert イオン源 9 mm HydroInert 抽出レンズ付き
シリンジ	Agilent ブルーラインオートサンブラシリンジ、10 µL、PTFE チッププランジヤ（部品番号 G4513-80203）
カラム	Agilent J & W DB-EUPAH GC カラム、20 m × 0.18 mm, 0.14 µm、7- インチケージ（部品番号 121-9627）
注入ロライナ	Agilent 注入ロライナ、ウルトライナート、スプリット、低圧力損失、ガラスウール入り（部品番号 5190-2295）

表 2. GC および MSD 機器の条件

パラメータ	設定値
注入量 (L1)	2 µL
注入の種類	2 層サンドイッチ (L1、L2)
L1 エアーギャップ	0.2 µL
L2 注入量	0.5 µL (内部標準サンドイッチ注入に使用)
L2 エアーギャップ	0.2 µL
注入口温度	320 °C
注入口モード	パルスドスプリットレス
セプタムバージ流量	3 mL/min
セプタムバージ流量モード	スイッチド
注入パルス圧力	40 psi (275.8 kPa)、0.75 分まで
スプリットベントへのバージ流量	0.7 分で 50 mL/min
カラム温度プログラム	60 °C (1 分間保持)、60 °C /min で 180 °C まで (0 分間保持)、3 °C /min で 335 °C まで (15 分間保持)
キャリアガスと流量	H ₂ 、定流量 0.9 mL/min
トランスファライン温度	320 °C
イオン源温度	320 °C
四重極温度	150 °C
データ取り込み	選択イオンモニタリング (SIM)
チューニング	etune.u
ゲイン係数	5

抽出に 20/80 EtOAc/ACN 溶媒を使用すると、脂肪の多いマトリックスから疎水性 PAH を抽出するのに十分な溶出力が得られます。Captiva EMR-Lipid を用いて追加で溶出させることにより、パススルークリーンアップ中に Captiva EMR-Lipid カートリッジからのターゲットの完全な溶出が保証されます。クリーンアップ後のイソオクタン抽出により、抽出溶媒からより GC に適した溶媒への交換が容易になり、部分的なサンプル濃縮もできます。

乳児用調製粉乳の場合、効率的な溶媒抽出を実現するために、最初に乾燥粉末を溶解することが重要です。乳児用調製粉乳を溶解するための水の添加に関して、10 mL の高水量と 2 mL の低水量を比較することにより調べました。図 3 は、2 つの異なる水添加量を使用した目標回収率の比較を示したものです。粉末溶解のための水の量が少ない (2 mL) 方が、ヘビー PAH の回収に重要な役割を果たしたことを明確に示す結果となりました。これは、

水の量が多い（10 mL）と、より疎水性の高い PAH の溶解度が低下し、抽出中にターゲットが失われる可能性があるためです。この結果をもとに以後の溶媒抽出では、2 g の乳児用調製粉乳を 2 mL の水に溶解しました。

分析装置

最近のヘリウム供給不足により、影響を受ける研究機関は H₂ キャリアガスの使用に関する調査を余儀なくされています。ただし、水素キャリアガスを利用した多くの GC/MS 分析では感度が低下し、分析種がイオン源で水素化または脱塩素化することが問題になっています。

乳児用調製粉乳ブランクの GC/MS 全イオンクロマトグラム（TIC）スキャンを図 4 に示します。ブランクマトリックスのフルスキャンでは、サンプルマトリックスのクロマトグラフバックグラウンドのベースラインが表示されます。標準サンプルのポストスパイクにはマトリックスブランクを使用しました。

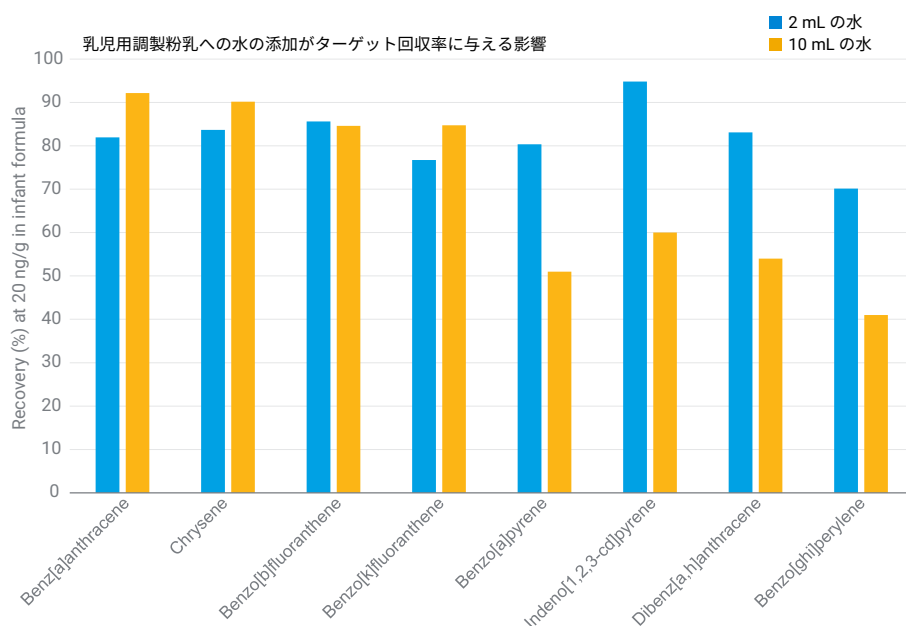


図 3. 溶媒抽出前に乳児用調製粉乳を溶解するために使用されるさまざまな水量に対する PAH 目標回収率の比較

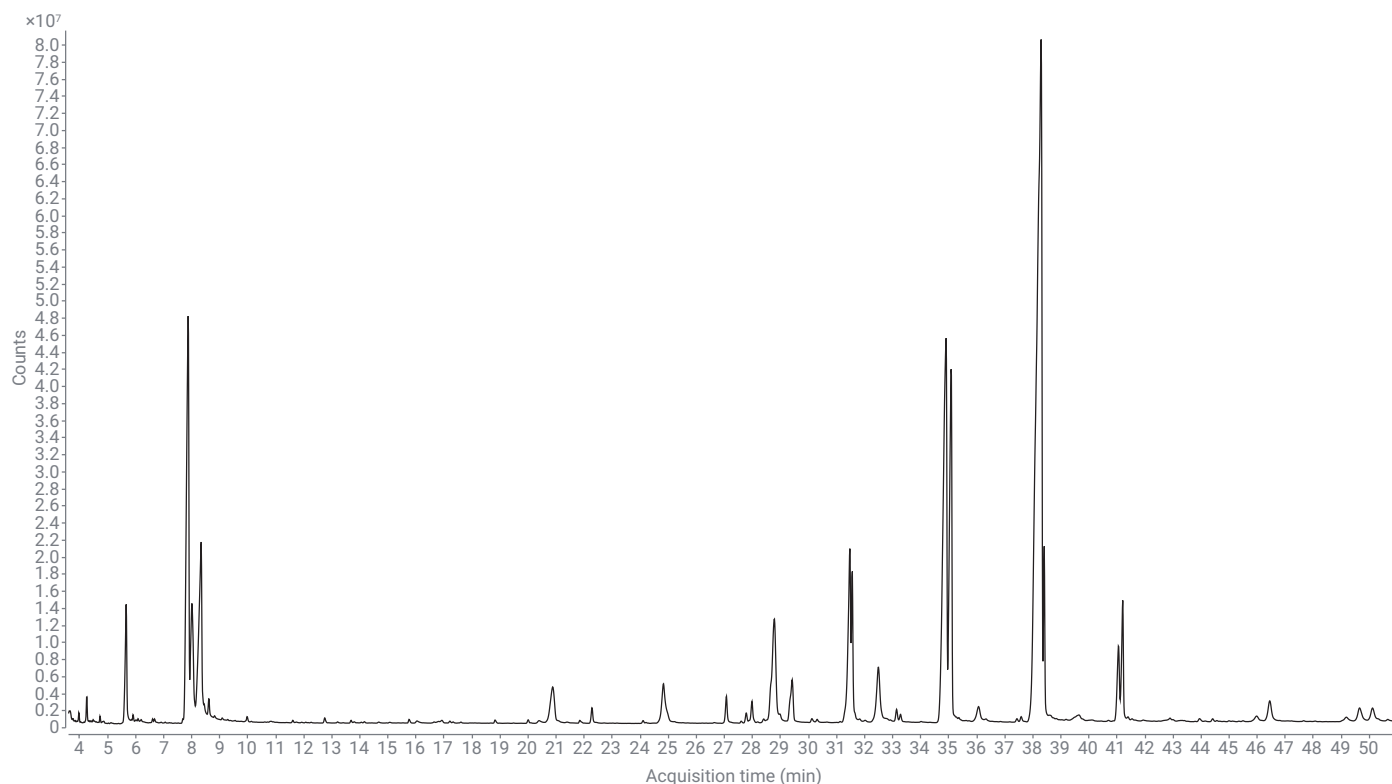


図 4. 乳児用調製粉乳マトリックスブランクの GC/MS TIC スキャン

乳児用調製粉乳中の PAH の定量には、バイアル中 0.1 ～ 20 ppb (乳児用調製粉乳中 0.5 ～ 100 µg/kg) の 7 つのキャリブレーション濃度でマトリックス適合キャリブレーションを使用しました。ターゲット化合物のリテンションタイム (RT) と直線性の値を表 3 に示します。BaP と PAH4 の定量濃度を 1 µg/kg 未満にできれば、欧州委員会規則 (EU) 番号 835/2011 を満たす正確な定量が可能になります。

メソッド回収率と再現性

プレスパイクされたサンプルの分析により、開発した定量メソッドの性能を評価することができました。ポストスパイクされた乳児用調製粉乳サンプル (乳児用調製乳抽出物中 1 ng/g) 中のターゲット PAH の GC/MS SIM クロマトグラムを図 5 に示します。

表 3. ターゲット PAH の分析データ

化合物	RT	直線性	定量イオン (m/z)	確認イオン 1 (m/z)	確認イオン 2 (m/z)
ベンゾ[a]アントラセン-d12	19.00		240.1	236.1	
ベンゾ[a]アントラセン (BaA)	19.15	0.999	228	226	229
クリセン-d12	19.50		240	236	
クリセン (Chr)	19.69	0.997	228.1	226.1	229
ベンゾ[b]フルオランテン-d12	26.50		264	260	
ベンゾ[b]フルオランテン (BaF)	26.67	0.998	252	250	253
ベンゾ[k]フルオランテン-d12	26.70		264.1	260.1	
ベンゾ[k]フルオランテン	26.85	0.994	252	250	253
ベンゾ[a]ピレン-d12	29.14		264.1	260.1	
ベンゾ[a]ピレン (BaP)	29.31	0.995	252.1	250.1	248
インデノ[1,2,3-cd]ピレン-d12	35.91		288	284	
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	36.05	0.998	276	274	277
ジベンゾ[a,h]アントラセン-d14	36.14		292	288	
ジベンゾ[a,h]アントラセン	36.35	0.998	278.1	276.1	279.1
ベンゾ[ghi]ペリレン-d12	37.71		288	287	
ベンゾ[ghi]ペリレン	37.86	0.997	276.1	274.1	277
ジベンゾ[a,i]ピレン-d14	46.45		316	317	

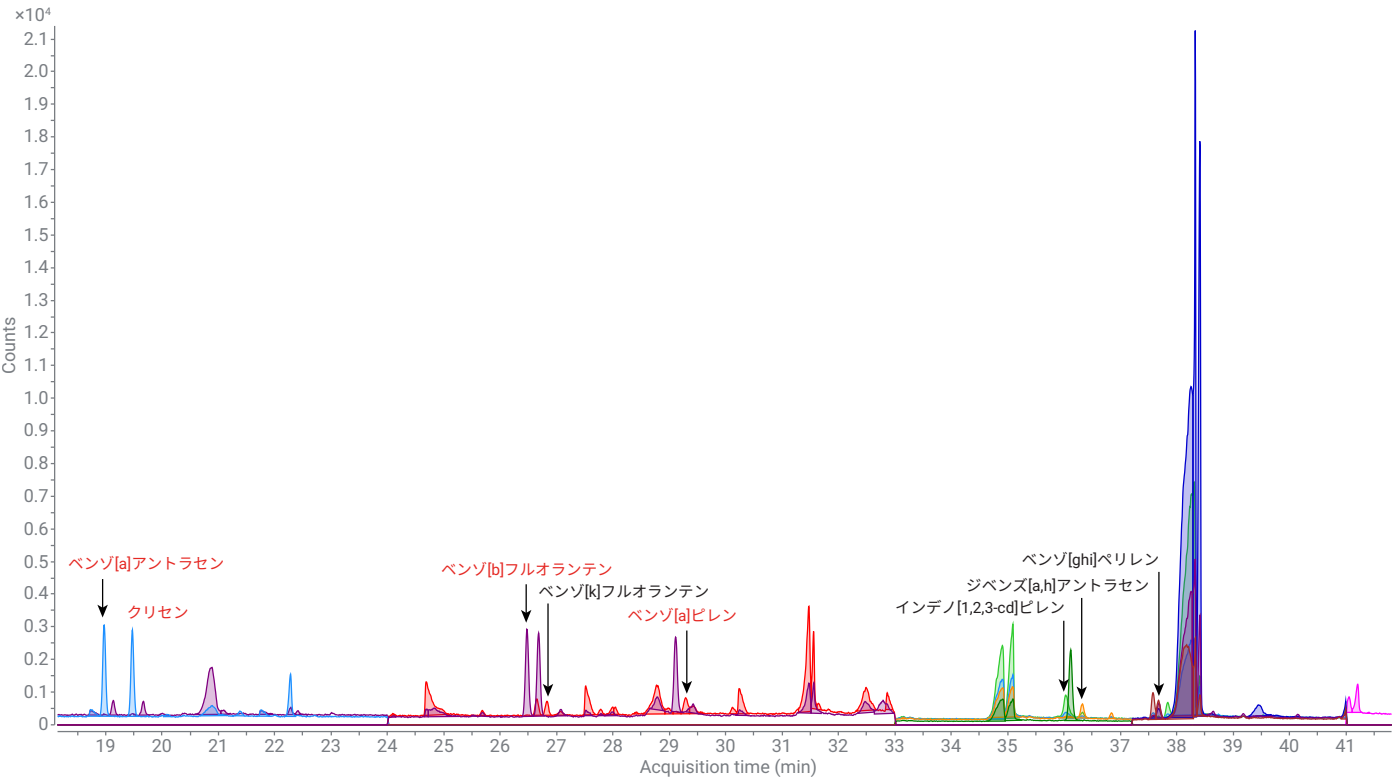


図 5. ポストスパイクされた乳児用調製粉乳サンプル (乳児用調製乳抽出物中 1 ng/g) 中の PAH の GC/MS SIM クロマトグラム

8 つの PAH のターゲット化合物の回収率を、プレスパイクおよびポストスパイクした乳児用調製粉乳サンプルの直接的なピーク面積比較に基づいて計算しました。その結果を図 6 に示します。重要な 4 つの PAH 化合物 (BaP、BaA、BbF、および Chr) は赤で示されています。

メソッド回収率と再現性の検証には、3 つの濃度の添加サンプルを使用しました。乳児用調製粉乳中の濃度は 1、10、および 50 ng/g で、各濃度で 6 回の繰り返し分析を行いました。

その結果、1 ng/g 濃度のベンゾ[k]フルオランテン (回収率 54 %) とベンゾ[ghi]ペリレン (34.6 % RSD) を例外として、メソッドが 20 % 未満の RSD で許容範囲内の 60 % を超える回収率 (60 ~ 95 %) を達成したことを確認しました。2 つの外れ値は、主に機器検出メソッドの感度が低く、1 ng/g 濃度でのマトリックスの影響が大きいためです。機器メソッドの感度と低濃度添加のサンプルに対するマトリックスの影響により、1 ng/g の濃度で RSD も高くなる結果となりました。

結論

このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の PAH 分析のために、溶媒抽出とそれに続く Agilent Captiva EMR-Lipid パススルークリーンアップを使用したサンプル前処理方法を紹介しました。本検討では、Agilent 8890 GC および 5977C GC/MSD システムで H₂ キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源を使用すると、低濃度の PAH を測定することも示しました。このメソッドは、食品中の PAH 分析に関する EU 規制を満たす許容可能な回収率および再現性・定量結果を実現しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE07135606

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 28, 2022

5994-5560JAJP

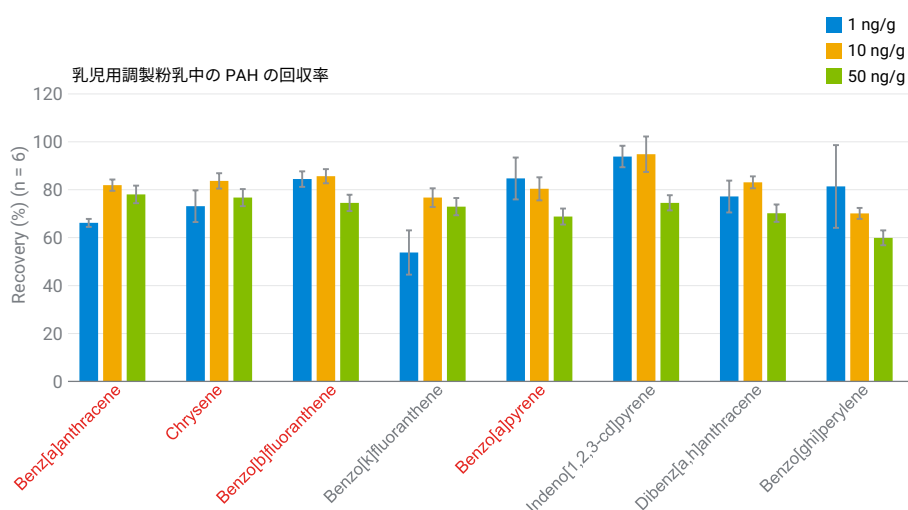


図 6. 乳児用調製粉乳中のターゲット PAH のメソッド回収率と再現性

参考文献

1. HydroInert イオン源を組み合わせた Agilent イナートプラス GC/MS システムの概要, Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-4889JAJP, **2022**.
2. Sampaio, G. R. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Biological Effects, Legislation, Occurrence, Analytical Methods, and Strategies to Reduce Their Formation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(11), 6010. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22116010>
3. European Commission, Food for Infants and Young Children. https://food.ec.europa.eu/safety/labelling-and-nutrition/specific-groups/food-infants-and-young-children_en (accessed 2022-11-14).
4. The European Commission, Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August **2011** Amending Regulation (EC) No 1831/2006 as Regards Maximum Levels for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foodstuffs. Official Journal of the European Union. L 215/4, rev 08.2011. <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0835&qid=1619334803026&from=EN> (accessed 2021-04-13).
5. Zhao, L.; Wong, D. Captiva EMR-Lipid クリーンアップと GC/MS/MS によるサケと牛肉に含まれる 19 種類の多環芳香族炭化水素化合物の測定, Agilent Technologies application note, publication number 5994-0553JAJP, **2020**.
6. Akinpelu, A. A. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Extraction and Removal from Wastewater by Carbon Nanotubes: A Review of the Current Technologies, Challenges and Prospects. *Process Saf. Environ. Prot.* **2019**, 122(10), 68–82.
7. Purcaro, G.; Barp, L.; Moret, S. Determination of Hydrocarbon Contamination in Foods. A review. *Anal. Methods* **2016**, 8(29), 5755–5772.