

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ による 2-/3-MCPD 脂肪酸エステルおよび グリシドール脂肪酸エステル間接分析法 (酵素法) の自動化



Authors

野原 健太¹⁾
高桑 裕史¹⁾
杉立 久仁代¹⁾
宮崎 絹子²⁾
鴨井 享宏²⁾

¹⁾ アジレント・テクノロジー株式会社

²⁾ ハウス食品グループ本社株式会社

要旨

2-/3-モノクロロ-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル (2-/3-MCPD-Es) およびグリシドール脂肪酸エステル (G-Es) 間接分析法 (通称、酵素法) による実試料と標準試料の前処理手順をスケールダウンし、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでの前処理自動化メソッドを構築しました。手動の酵素法前処理と同等の検量線と実試料の定量値ならびに再現性が得られ、本アプリケーションノートで構築した自動化メソッドにより、手動での酵素法と同等の 2-/3-MCPD-Es、G-Es 分析が可能であると考えられました。小スケール化・自動化により、溶媒消費量の削減、作業者間の前処理誤差の排除、作業者の手間の軽減および有機溶媒への暴露の回避などさまざまな効果が期待されます。

1. はじめに

3-モノクロロ-1,2-プロパンジオール（3-MCPD）およびグリシドールは、リスク評価が行われている物質の一種です。食用油脂の精製工程において、脂肪酸と 3-MCPD、グリシドールが結合したエステル体（3-MCPD-Es, G-Es）が非意図的に生成されます（図 1）。3-MCPD-Es と G-Es は体内で遊離型の 3-MCPD、グリシドールに分解される可能性があり、EU やアジア諸国など各国において基準値が設けられています¹⁾。また、3-MCPD の異性体である 2-モノクロロ-1,2-プロパンジオール（2-MCPD）も同様にエステル体として食用油脂の精製工程で生成されると報告されています²⁾。

3-MCPD-Es と G-Es を測定する手法は、直接分析法と間接分析法に大別されます。直接分析法では主に液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）が用いられ、エステル体を測定対象とするため、定量分析ではそれぞれ対応する複数の標準品が必要となります³⁾。一方、間接分析法ではエステル加水分解により開裂した遊離体を誘導体化し、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）で測定することで、それぞれの遊離型相当濃度を求めます。そのため、間接分析法では必要な標準品の数が少なく、2-/3-MCPD-Es・G-Es の品質管理やスクリーニングに適しています。

間接分析法の1つとして、ハウス食品グループ本社株式会社により酵素を用いた加水分解を特徴とする手法が開発され（通称、酵素法）、日本油化学会や米国油化学会（AOCS）の基準法として登録されています^{4), 5)}。酵素法では、リパーゼによるエステル加水分解、グリシドール臭素化、誘導体化を経てガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）で測定します。酵素法は他の間接分析法に比べて前処理の時間が短く、2-/3-MCPD-Es および G-Es を同時に分析できるといった利点があります。

本アプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ（以下、ワークベンチ）を用いた酵素法の前処理自動化メソッドを構築し、その評価を行いましたので報告します。




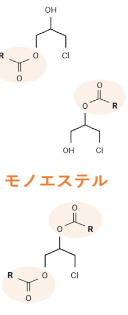
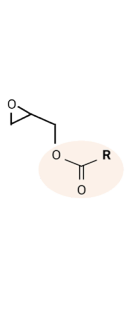
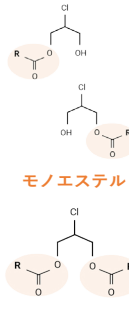
遊離型 分析種	3-MCPD	グリシドール	2-MCPD
			
エステル型 分析種	3-MCPDエステル (3-MCPD-Es)	グリシドールエステル (G-Es)	2-MCPDエステル (2-MCPD-Es)
			

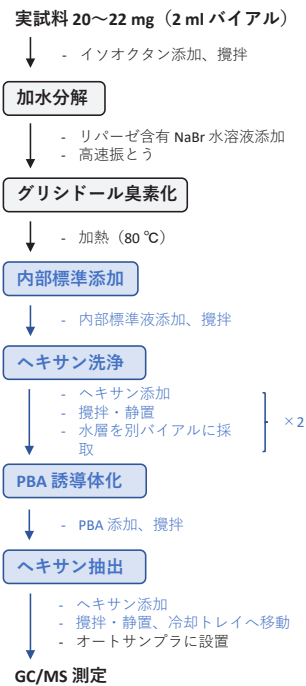
図 1. 2-/3-MCPD、グリシドールの遊離型とエステル型

2. 実験方法

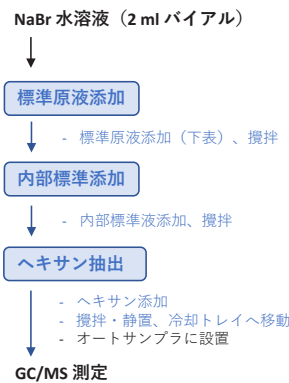
2-1. 前処理の自動化

酵素法の前処理は、基準油脂分析試験法 2.4.14-2016 記載の手順に従い、濃縮は行いませんでした。実試料は市販のパーム油・米油・サラダ油・ごま油・ラード（固体）を用いました。ワークベンチは 2 mL バイアルにおける添加・攪拌・加熱・冷却により、誘導体化・液液抽出・希釈などの前処理自動化メソッドを構築することが可能です。自動化ワークフローを図 2 に示しました。操作性等を考慮し、図 2 の青字部分を自動化しました。

実試料の前処理自動化ワークフロー



標準試料の前処理ワークフロー



サンプル名	標準原液濃度	添加量
Std0 (Blank)	-	-
Std 1	0.15 µg/mL	10 µL
Std 2	1.5 µg/mL	4 µL
Std 3	1.5 µg/mL	10 µL
Std 4	1.5 µg/mL	20 µL
Std 5	15 µg/mL	4 µL
Std 6	15 µg/mL	7 µL
Std 7	15 µg/mL	10 µL
Std 8	15 µg/mL	16 µL

図 2. 酵素法自動化ワークフロー自動化ステップを青字で表記（左 = 実試料 右 = 標準）

表 1. 酵素法前処理における自動化法の主な変更点

手法	原法	自動化法
試料量	100 ～ 110 mg	20 ～ 22 mg
操作器具	10 mL 試験管 全量ピペット、マイクロピペット	2 mL バイアル シリンジ
標準試料調製	1.5 µg/mL、15 µg/mL の標準原液を 分注して濃度系列を作成	0.15 µg/mL、1.5 µg/mL、15 µg/mL の標準原液を 分注して濃度系列を作成
ヘキサン洗浄	ヘキサン添加 → 攪拌・遠心分離 → ヘキサン除去	ヘキサン添加 → 攪拌・静置 → 水層を別バイアルに採取
ヘキサン抽出	ヘキサン添加 → 攪拌・遠心分離 → ヘキサン層を別バイアルに採取 → GC/MS 注入	ヘキサン添加 → 攪拌・静置 → オートサンブラの一定高さでヘキサン層を GC/MS 注入
総ヘキサン消費量（実試料 1 点あたり）	9 mL	1.2 mL
総ヘキサン消費量（標準試料 1 点あたり）	3 mL	0.8 mL

2-2. 分析条件

分析はシングル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 Agilent 8890 と Agilent 5977B GC/MSD で行いました。ポストカラムバックフラッシュオプションを用いました。

（自動液体サンブラ：Agilent 7693A ALS）

注入量： 4 µL
シリンジ洗浄： アセトン、ヘキサン

（GC：Agilent 8890 GC）

注入口： スプリット/スプリットレス注入口
注入モード： スプリットレス
ライナー： Splitless, single taper, wool, Ultra Inert liner（部品番号：5190-2293）
注入口温度： 250°C
カラム： VF-5ms (30 m, 0.25 mm, 1.0 µm)（部品番号：CP8946）
リストリクタ： InertFusedSilica (1.2 m, 0.15 mm)
カラム流量： He（定流量 1.75 mL/min）
オープン条件： 80°C (1 min) - 25°C/min - 180°C - 2°C/min - 200°C
バックフラッシュ： 220°C, 8.9 min（カラム空隙 10 相当）
インタフェース温度： 280°C

（MS：Agilent 5977B GC/MSD）

イオン化法： 電子イオン化法（EI）
イオン源温度： 280°C
チューニング： 高感度チューニング（etune）
測定モード： SIM (m/z = 147, 150, 196, 198, 201, 203, 240, 245)

3. 結果と考察

3-1. 2 mL バイアルスケールへの小スケール化とワークベンチによる自動化

本来、酵素法の前処理は 10 L 試験管スケールで行われます（以下、原法と称します）。ワークベンチは 2 mL バイアルで操作が行われるため、酵素法の前処理手順を 2 mL バイアルスケールに変更し、実試料と標準品の前処理自動化メソッドを構築しました。スケールダウンの利点として、試料量や前処理で消費する溶媒（ヘキサン）量が大幅に削減される点が挙げられます。

原法と同等の結果を得るために、ワークベンチの条件最適化を予め行いました。例えば、ヘキサン洗浄/抽出の工程は遠心分離の代わりに静置を行ったため、攪拌速度や静置時間等の条件最適化を行いました。また、試薬・溶媒の添加やサンプルの吸引においてワークベンチではピペットの代わりにシリンジを使用するため、各ステップでのシリンジ吸引/排出速度・深さ・洗浄条件などのパラメータについても同様に最適化を行いました。自動化法の前処理における主な変更点を表 1 に記載しました。

なお、ワークベンチではシーケンスを設定することで、実試料と標準品の連続自動処理を行うことが可能です。

3-2. 原法と自動化法の比較 検量線、クロマトグラム

最適化したワークベンチの自動化メソッドを用いて標準試料を調製し、GC/MS で測定しました。原法と同様に、2.5、10、25、50、100、175、250、400 ppb（回収率100%と仮定した場合の検液中最終濃度）の計 8 点で、内部標準法により検量線を作成しました。測定対象である 3-MCPD、2-MCPD、3-MBPD（グリシドール）は、それぞれ決定係数R² 0.999 以上の非常に良好な直線性が得られました（図 2）。また、手動で調製した標準品での検量線と比較すると、傾き・直線性はいずれもほぼ同等であることが確認できました（表 2）。

続いて、市販のパーム油をワークベンチで自動前処理した際の測定結果を図 3 に示しました。前述の通り自動化にあたり工程や使用器具などを変更しましたが（表 1）、3-MCPD、2-MCPD、3-MBPD（グリシドール）いずれも原法で前処理を行った場合と同等のクロマトグラムが得られていることが確認できました。

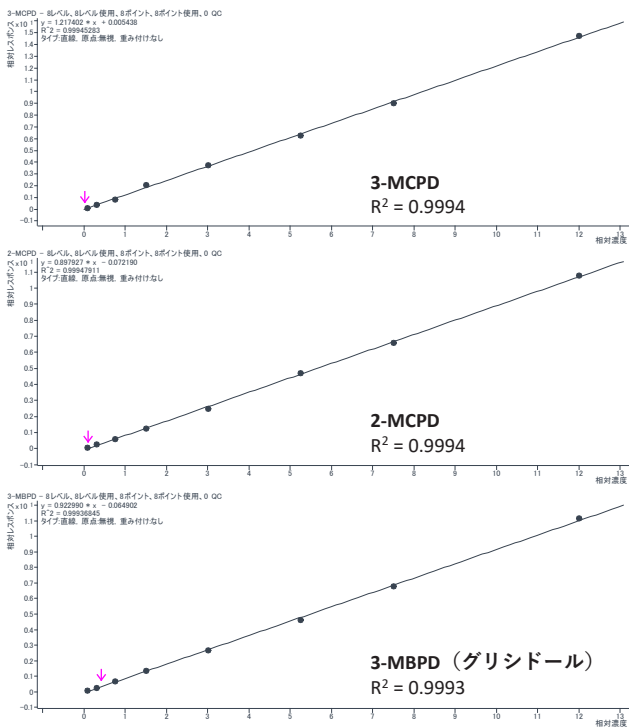


図 3. 自動化法で調製した標品を用いて作成した検量線

表 2. 原法と自動化法の検量線比較（上：近似式 下：決定係数 R²）

	3-MCPD	2-MCPD	MBPD
原法	$y = 1.2344x - 0.0759$ $R^2 = 0.9997$	$y = 0.9025x - 0.0745$ $R^2 = 0.9997$	$y = 0.9111x - 0.0455$ $R^2 = 0.9999$
自動化法	$y = 1.2174x + 0.0054$ $R^2 = 0.9994$	$y = 0.8979x - 0.0721$ $R^2 = 0.9994$	$y = 0.9230x - 0.0649$ $R^2 = 0.9993$

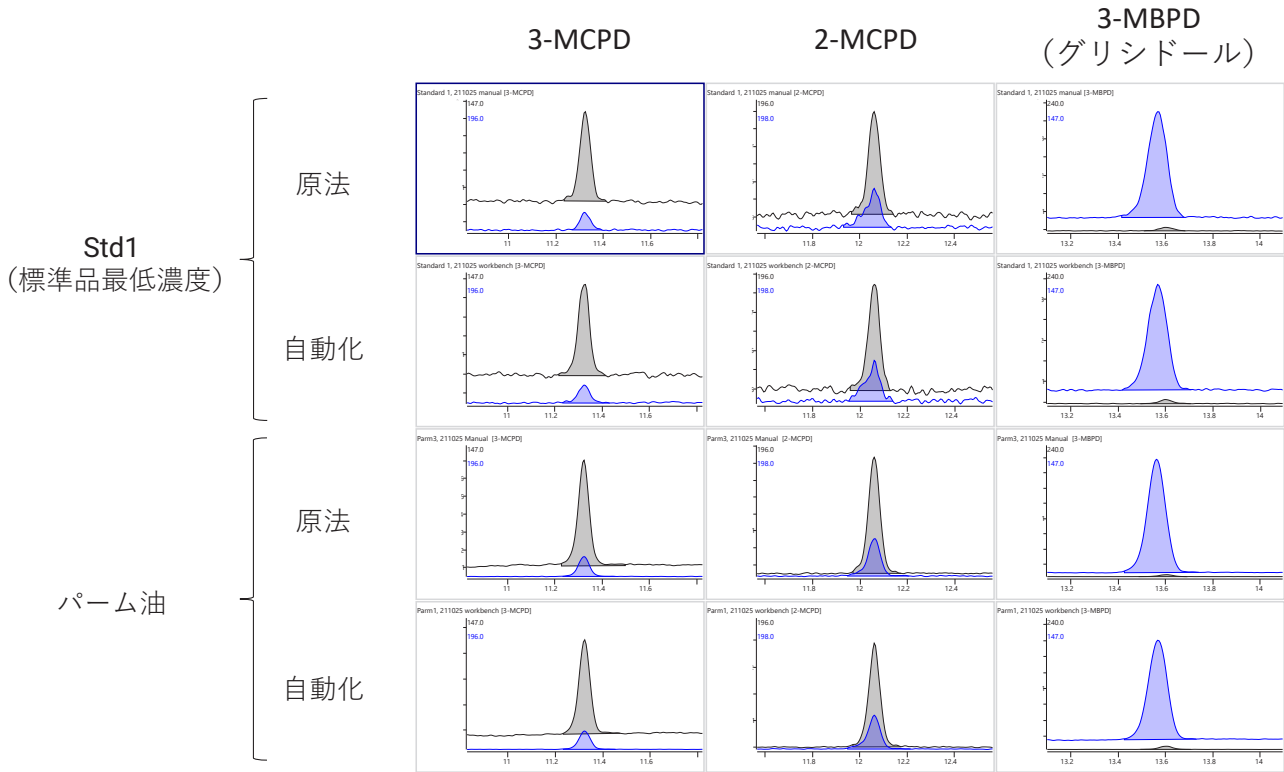


図 4. 標準品（最低濃度）とパーム油の SIM クロマトグラム比較（原法と自動化法）

表 3. 実試料での定量値比較 (原法・自動化法それぞれ n = 3 で前処理を実施)

サンプル	手法	3-MCPD (mg/kg)		2-MCPD (mg/kg)		グリシドール (mg/kg)	
		定量値平均	RSD%	定量値平均	RSD%	定量値平均	RSD%
パーム油	原法	0.432	0.6	0.318	2.9	0.128	4.9
	自動化	0.436	2.1	0.306	1.1	0.121	4.9
米油	原法	0.152	3.5	0.109	3.1	1.239	1.0
	自動化	0.152	3.8	0.107	4.0	1.217	2.7
サラダ油	手動	0.042	2.7	0.053	5.3	0.348	1.5
	自動化	0.054	2.1	0.066	1.9	0.350	1.3
ゴマ油	手動	0.070	2.1	0.057	1.0	0.046	0.5
	自動化	0.073	5.0	0.064	3.3	0.041	1.8
ラード	手動	0.079	8.4	0.092	3.0	0.054	1.2
	自動化	0.104	5.1	0.101	3.6	0.051	1.2

3-3. 原法と自動化法の比較 定量値

市販の 5 種の実試料（米油・パーム油・サラダ油・ゴマ油・ラード）について、原法と自動化法の定量値と再現性を比較しました（表 3）。各実試料について、定量値の平均値はよく一致しており、自動化メソッドにおいてもほぼ同等の測定結果が得られました。n = 3 における相対標準偏差 RSD%は概ね 5 以下であり、同等あるいはそれ以上の再現性が得られていることが確認されました。

以上の結果から、ワークベンチにより酵素法の前処理手順を自動化することで、手動で行われる原法と同等の 2-/3-MCPD-Es、G-Es の分析が可能になると考えられました。

4. まとめ

本アプリケーションノートでは、2-/3-MCPD-Es、G-Es の間接分析法の 1 つである酵素法について、実試料と標準品調製手順をスケールダウンし、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでの自動化メソッドを構築しました。自動化法において手動と同等の検量線、クロマトグラム、定量結果が得られることが確認でき、原法と同等の 2-/3-MCPD-Es、G-Es の分析法が可能であると考えられました。

スケールダウンと前処理の自動化により、溶媒消費量の削減、作業者間の前処理誤差の排除、作業者の手間の軽減、作業者の有機溶媒への暴露の回避など、さまざまな効果が期待されます。

5. 参考文献

- 1) 農林水産省 HP クロロプロパノール類及びその関連物質の分析法 https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c_propanol/method.html#free
- 2) 農林水産省 食品安全に関するリスクプロファイルシート (化学物質) https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/210115_2mcpde.pdf
- 3) Agilent 6460 による食用油中グリシドール脂肪酸エステルおよび 3-MCPD 脂肪酸時エステルの同時分析 (LCMS-201108TK-001)
- 4) 日本油化学会 基準油脂分析試験法2.4.14-2016
- 5) Joint JOCS/AOCS Official method Cd 29d-19

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。

DE42761039

アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2021
 Printed in Japan, December 31, 2021
 5994-4497JAJP