

トリガーMRM法を用いたLC-MS/MSによる 3-MCPD 脂肪酸エステルの個別分析法

Individual analysis method of 3-MCPD fatty acid
ester by LC-MS/MS using Trigger-MRM method

滝埜昌彦

Masahiko TAKINO

アジレント・テクノロジー(株)ライフサイエンス化学分析本部

〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

TEL: 0120-477-111

Masahiko_takino@agilent.com

1.はじめに

3-MCPD は 1978 年にタンパク加水分解物中の毒性成分として発見された物質であるが、近年 3-MCPD の脂肪酸モノエステル及びジエステルが精製食用油や種を焙煎して製造する食用油に高濃度で含有することが報告されている。これら化合物の生体中での 3-MCPD への代謝については不明であるが人への暴露量の評価には適切な分析法の開発が急がれている。これら化合物の食用油中の分析法としては 3-MCPD 脂肪酸エステルの総量分析法と個々の脂肪酸エステル類を個別分析する方法に大別できる。総量分析法は試料中から遊離 3-MCPD を除去後、全脂肪酸エステルを加水分解、GC-MS で 3-MCPD を測定する方法である。この方法は総量測定が可能であり試料の安全性評価には有効な手法である。一方、個別分析法は直接脂肪酸エステル類を測定する方法である。したがって、HPLC を用いた方法が一般的である。特にタンデム四重極型質量分析計を使用した MRM 法による分析法は高感度、高選択的分析が可能であることから有効な測定法である。しかし MRM 法は特定のプロダクトイオンのみを用いて測定することから確認法としては不十分である。したがって最近では MRM 法でのシグナルをトリガーとしたプロダクトイオンスキャンを組み合わせた方法が用いられている。この方法では MRM 法で検出されたピークが一定強度以上の場合、プロダクトイオンスキャン法によりフルプロダクトイオンスキャンスペクトルを測定することで、化合物の確認をする方法である。しかし MRM 法とプロダクトイオンスキャン法との感度差や取り込み速度の違いなど問題点があり普及していない。そこで微量定量分析と同時に信頼性の高い確認法としてダイナミック MRM 法を改良したトリガーMRM 法を用いた食用油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの個別分析法の検討を行ったので紹介する。

2.実験

2.1.試薬および試料

10 種類の 3-MCPD 脂肪酸エステル及び重水素ラベル化 3-MCPD 脂肪酸エステル標準品は和光純薬工業製から購入し使用した。試料は菜種油、ごま油(焙煎、未焙煎)、オリーブ油(精製、未精製)を用い IPA で 200 倍希釈した試料を直接 LC/MSMS で測定を行った。

2.2.装置および測定条件

LC-MS には Agilent 製 Agilent6490 triple quadrupole LC-MS(LC-MS/MS)を使用した。分析用カラムには Agilent 製 ZORBAX Eclipse Plus C18(100mm, 2.1mm, 1.8 μm)、移動相には IPA 及び 10mM ギ酸アンモニウム水溶液を使用した。定量及び確認分析にダイナミック MRM 法を改良したトリガーMRM 法を使用した。また、添加回収率及び試料由来成分によるイオン化阻害を補正する目的でサロゲート物質として重水素でラベル化した 3-MCPD モノパ

ルンミテート-d₅、3-MCPD ジステアレート-d₅、3-MCPD ジパルミテート-d₅ 及び 3-MCPD ジリノレネート-d₅ の安定同位体を使用した。

3-MCPD 脂肪酸エステルのトリガーMRM 条件は全ての 3-MCPD 脂肪酸エステルでプリカーサーイオンをアンモニウム付加イオンとした。プロダクトイオンの定量用イオン(Primary ion)には 3-MCPD が脱離したイオン(脂肪酸モノエステル)及び脂肪酸が脱離したイオン(脂肪酸ジエステル)を選択し、スペクトル構築用イオン(Secondary ion)には強度の強いプロダクトイオンを 1~3 イオン選択し、プロダクトイオンスペクトルを構築した。詳細な条件は表.1 及び 2 に示した。

表 1 LC-MS/MS 法による 3-MCPD 脂肪酸エステル類の分析条件

HPLC	: Agilent 1260 Infinity LC system
Column	: ZORBAX Eclipse plus C18 (100mm, 2.1mm, 1.8μm)
Mobile phase	: A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ B: IPA 50% B---(30min)---100% B
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 10 μl
Flow rate	: 0.2 ml/min
MS	: Agilent 6460 triple quadrupole LC/MS system
Ionization	: Agilent Jet Stream(AJS)(正イオンモード)
Drying gas	: 10 L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 120V
Vcap	: 4000V
tMRM condition	: table2

表 2 トリガーMRM 法の分析条件

Compound	Precursor	Product	Primary	Threshold	CE	RT	DeltaRT	Compound	Precursor	Product	Primary	Threshold	CE	RT	DeltaRT
MLn	388.3	261.1	x	80	4	7.91	1.89	DLn-d5	653.5	358.2	x	1000	17	21.55	1.00
MLn	388.3	371.2		0	0	7.91	1.89	DLn	648.5	353.2	x	300	17	21.62	1.66
MLn	388.3	95.2		0	20	7.91	1.89	DLn	648.5	631.4		0	9	21.62	1.66
MLn	388.3	81.1		0	20	7.91	1.89	DLn	648.5	595.4		0	13	21.62	1.66
ML	390.3	263.3	x	140	4	9.1	1.69	DLn	648.5	261.2		0	17	21.62	1.66
ML	390.3	373.3		0	0	9.1	1.69	DL	652.5	355.1	x	400	17	23.19	1.09
ML	390.3	245.2		0	4	9.1	1.69	DL	652.5	263.0		0	17	23.19	1.09
ML	390.3	81.0		0	20	9.1	1.69	DP-d5	609.5	336.2	x	1000	13	24.31	1.00
MP-d5	371.2	239.3	x	1000	4	9.95	1.00	DP	604.5	331.3	x	1000	13	24.4	1.63
MP	366.3	239.3	x	60	4	10.01	1.83	DP	604.5	551.6		0	9	24.4	1.63
MP	366.3	349.1		0	0	10.01	1.83	DP	604.5	239.3		0	13	24.4	1.63
MP	366.3	71.0		0	20	10.01	1.83	DP	604.5	57.1		0	25	24.4	1.63
MP	366.3	57.2		0	20	10.01	1.83	DO	656.5	639.5		0	9	24.61	1.45
MO	392.3	265.1	x	70	8	10.54	2.28	DO	656.5	603.4		0	13	24.61	1.45
MO	392.3	375.2		0	0	10.54	2.28	DO	656.5	265.2		0	17	24.61	1.45
MO	392.3	247.1		0	12	10.54	2.28	DO	656.5	357.3	x	800	17	24.63	1.45
MS	394.2	377.0	x	0	4	12.45	1.97	DS-d5	665.5	364.2	x	1000	13	26.27	1.00
MS	394.2	267.2	x	50	4	12.46	1.97	DS	660.6	359.3	x	700	13	26.33	1.16
MS	394.2	71.0		0	20	12.48	1.97	DS	660.6	607.5		0	9	26.33	1.16
MS	394.2	57.0		0	20	12.48	1.97	DS	660.6	267.2		0	17	26.33	1.16
								DS	660.6	57.1		0	25	26.33	1.16

3.結果および考察

3.1.各 3-MCPD 脂肪酸エステルの分析条件の最適化

3-MCPD 脂肪酸エステルは ESI 法で全てアンモニウム付加体がベースピークイオンとして観察されたことから、全ての脂肪酸エステルのプリカーサーイオンはアンモニウム付加体とした。図 1 にアンモニウム付加体をプリカーサーイオンとした MSMS スペクトルの一例を示

したが、モノエステルは 3-MCPD が脱離したイオン、ジエステルは脂肪酸が脱離したイオンがベースピークとして観察された。したがって、トリガーMRM 法での primary ion はこれらイオンを選択した。また、プロダクトイオンスペクトルを構築するための secondary ion は強度の強い順に 1~3 イオン選択し、各プロダクトイオンは強度が最大となる様にコリジョンエネルギーの最適化を行った。primary ion のトリガーとなる閾値は、1ppb 標準溶液でのピーク強度の 50% 値に設定した。secondary ion の測定数は 5 ポイントとした。

各 3-MCPD 脂肪酸エステルの分離条件は表 1 に示したが、ジエステルの脂溶性が高いことから移動相には IPA を使用した。またアンモニウム付加体が強く観察されることから 10mM 酢酸アンモニウム水溶液とのグラジエント条件で分離条件を最適化した。

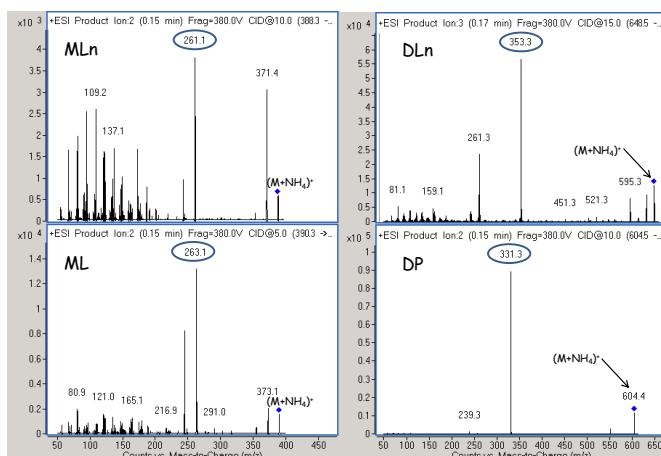


図 1 3-MCPD 脂肪酸エステル類の MSMS スペクトル

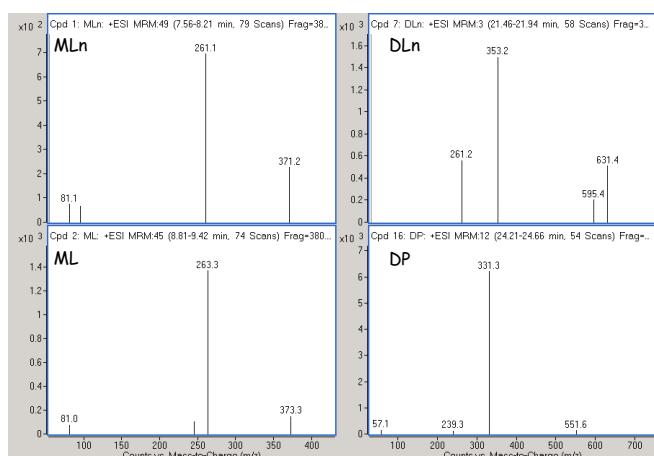


図 2 3-MCPD 脂肪酸エステル類の MRM 法によるプロダクトイオンスペクトル

3.2. 各 3-MCPD 脂肪酸エステルの感度、直線性

各 3-MCPD 脂肪酸エステルの感度に関しては図 3 に 0.1ppb での MRM クロマトグラムを示した。各 3-MCPD 脂肪酸エステルの S/N 比は 16~120 であり S/N=3 を検出限界とした場合の各 3MCPD エステルの検出限界は 0.019~0.003ppb であった。また、直線性に関しては 0.1~25ppb 範囲の内部標準法による検量線により評価を行った。結果は図 4 に各 3-MCPD 脂肪酸エステルの検量線を示したが、全 3-MCPD 脂肪酸エステルにおいて決定係数が 0.999 以上と良好であった。

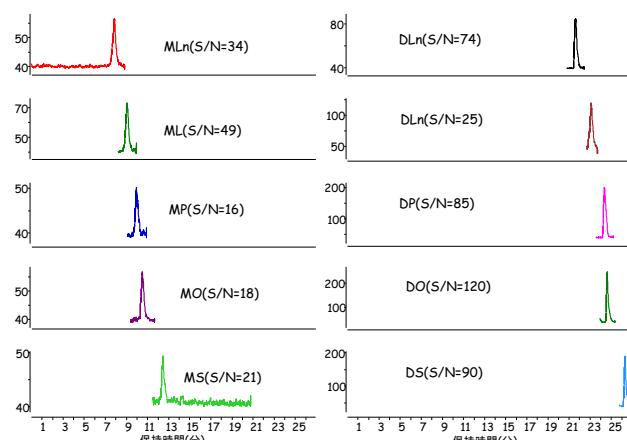


図 3 各 3-MCPD 脂肪酸エステルの MRM クロマトグラム

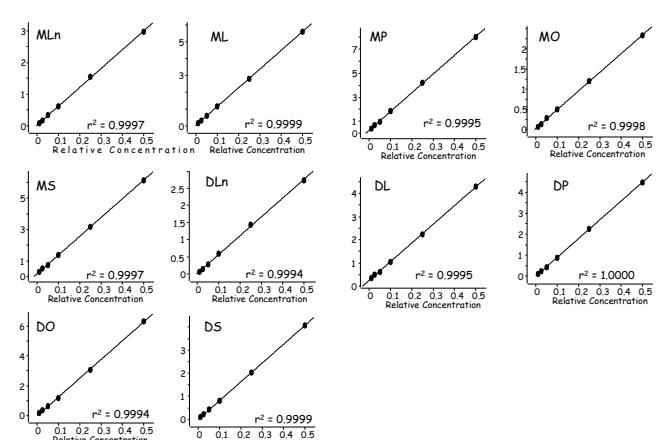


図 4 各 3-MCPD 脂肪酸エステルの検量線

3.3. トリガーMRM 法による 3-MCPD 脂肪酸エステルの測定

トリガーMRM 法ではプロダクトイオンとして primary ion と secondary ion を選択するが、これらイオンについてはプロダクトイオンスキャンモードで測定したスペクトルから強度強いイオンを順に選択し、各イオンが最大強度となるようにコリジョンエネルギーの最適化を行った。各 3-MCPD 脂肪酸エステルのトリガーMRM 条件は表 2 に示した通りである。図 5 にはトリガーMRM 法で測定した各 3-MCPD 脂肪酸エステルのプロダクトイオンスペクトルを示した。また、primary ion の強度は通常の MRM 法と比較して全ての 3-MCPD 脂肪酸エステルで 90%以上と顕著な低下は認められなかった。図 6 にはトリガーMRM 法と通常の MRM 法で測定した 3-MCPD モノステアレート(MS)のクロマトグラムを示したが、トリガーMRM 法での secondary ion の測定は primary ion のピーク中のみ(5 ポイント)であることからベースラインノイズが高くなることはなく、S/N 比の顕著な違いはなかった。

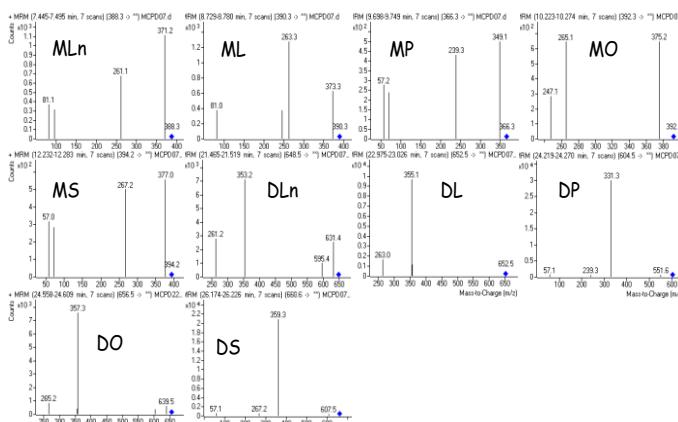


図 5 各 3-MCPD 脂肪酸エステルのプロダクトイオンスペクトル

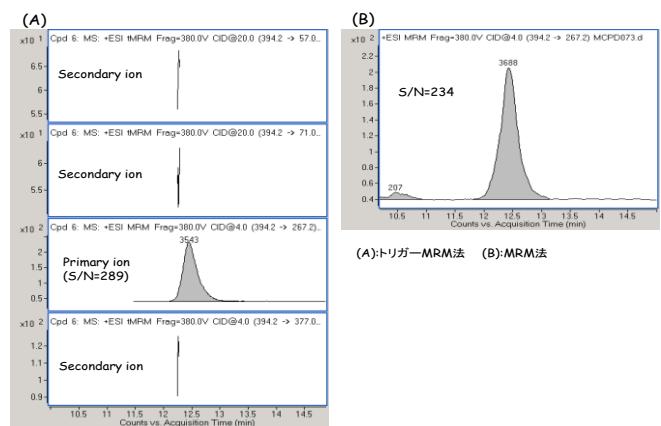


図 6 MS の MRM クロマトグラム

3.4. 試料前処理法

食用油からの各 3-MCPD 脂肪酸エステルの抽出に関しては、食用油の主成分であるトリグリセリドと測定対象の 3-MCPD 脂肪酸ジエステルの性質が類似していることから選択的に 3-MCPD 脂肪酸エステルを抽出することは困難である。しかし食用油を有機溶媒で溶解したのみではトリグリセライドによるイオン化阻害により 3-MCPD 脂肪酸エステルの強度が低下する。溶解する有機溶媒はヘキサンなど極性の低い溶媒の場合、モノ脂肪酸エステルのピーク形状が悪くなることから IPA とした。試料中トリグリセライドによる 3-MCPD 脂肪酸エステルのイオン化阻害の検証には、菜種油中に 3-MCPD 脂肪酸エステルを既知量添加し IPA で 100,200 および 500 倍となる様に溶解した試料を測定した。結果は図 7 に示したが、希釈倍率を 500 倍とすることで顕著なイオン化阻害は認められなかった。しかし、測定感度を考慮して試料を溶解した際の希釈倍率は 200 倍とした。また、この希釈倍率では脂肪酸ジエステルの強度はイオン化阻害により低下することから 3-MCPD 脂肪酸エステルを重水素でラベル化した化合物をサロゲート物質として使用することは有効であった。

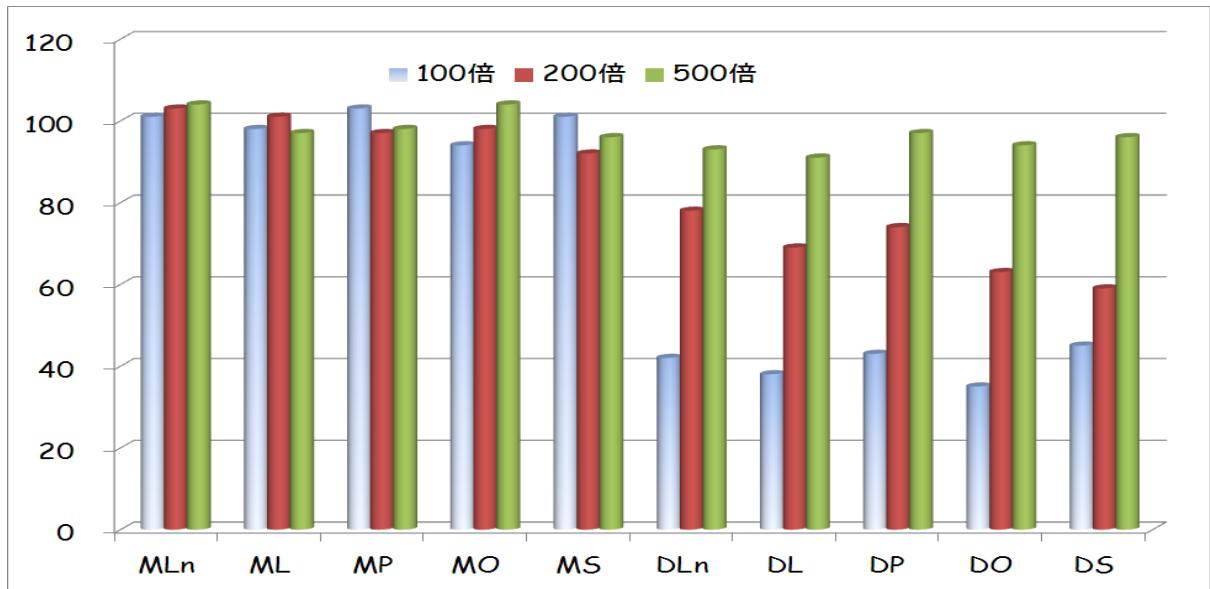


図 7 菜種油中各 3-MCPD 脂肪酸エステルの標準溶液に対する相対強度

3.5. 食用油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの測定

食用油中に 3-MCPD 脂肪酸エステル標準液を添加した試料(濃度:200ng/g)を IPA で溶解(200 倍希釈)した試料のトリガーMRM 法での primay ion の MRM クロマトグラムは図 8 に示した。これらのクロマトグラムの S/N 比は 98~376 であり標準溶液の MRM クロマトグラムと比較して試料由来ピークは認められなかった。表 3 には菜種油中各 3-MCPD 脂肪酸エステルの 200ng/g での S/N 比、検出限界(S/N=3)及びプロダクトイオンスペクトルの今回構築した 10 種 3-MCPD 脂肪酸エステルのライブラリ中プロダクトイオンスペクトルとの類似度を示した。再現性じや n=5 で測定したが、ピーク強度の相対標準偏差は 1.6~3.4% と良好であった。類似度は 78~98 であった。図 9 には標準溶液(0.1~5ppb)及び 5 種類の食用油中 3-MCPD 脂肪酸エステルのプロダクトイオンスペクトルを示した。

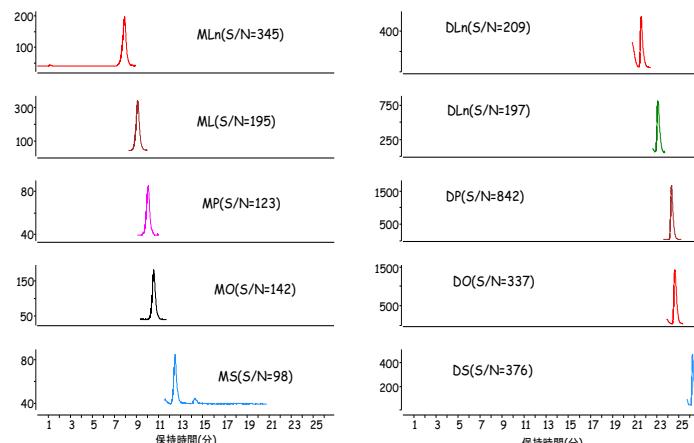


図 8 菜種油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの MRM クロマトグラム

表 3 3-MCPD 脂肪酸エステルの検出限界、再現性およびライブラリマッチ度

	S/N	検出限界	再現性	ライブラリマッチ度
	200ng/g	ng/g	RSD(%)	
MLn	345	1.74	1.8	96-98
ML	195	3.08	2.1	94-98
MP	123	4.88	3.4	93-97
MO	142	4.23	3.1	91-94
MS	98	6.12	1.7	93-97
DLn	209	2.87	3.3	90-95
DL	197	3.05	1.7	84-93
DP	842	0.71	2.4	82-91
DO	337	1.78	1.7	80-94
DS	376	1.60	1.6	78-93

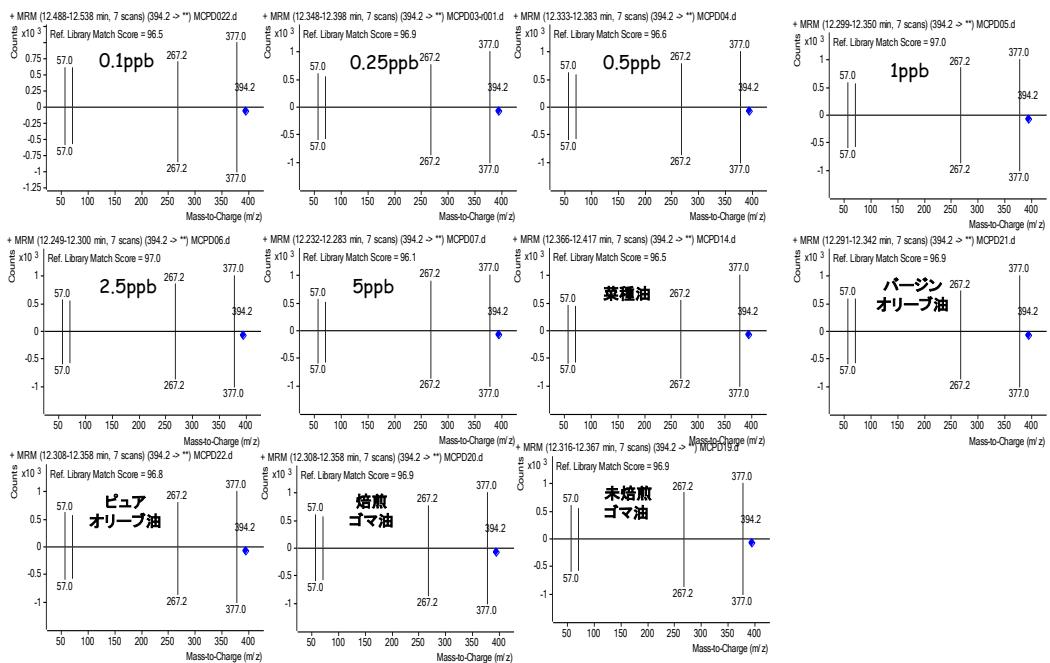


図 9 3-MCPD モノステアレートのプロダクトイオンスペクトル

3.6. 食用油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの測定

食用油の分析例は菜種油中各 3-MCPD 脂肪酸エステルの MRM クロマトグラムを図 10 に示した。また今回測定した 5 種類食用油の結果は表 4 に示した。検出された 3-MCPD 脂肪酸エステルはジエステルが主体でモノテステルは精製オリーブ油からモノオレイン酸エステルのみ検出された。ジエステルの濃度は 1~1245 ppb であり、検出された 3-MCPD 脂肪酸エステルのライブラリとの一致度は 35~94 であった。特にスペクトルが単純な化合物の一致度が低濃度で低下した。

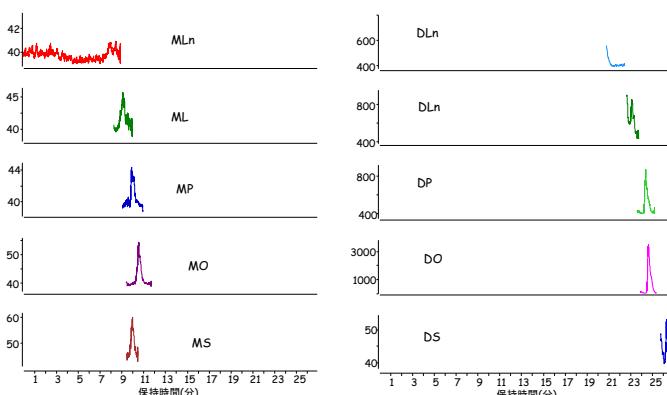


図 10 菜種油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの MRM クロマトグラム

4. 結論

今回 LC-MS/MS を使用したトリガーMRM 法による 3-MCPD 脂肪酸エステルの個別分析法を検討した。その結果、サロゲート物質に安定同位体を用いた内部標準法を用いることで食用油を IPA で溶解、200 倍希釈のみで直接測定が可能であった。

各 3-MCPD 脂肪酸エステルの検出限界は食用油中 0.7~6.2 ng/g、再現性は相対標準偏差が 1.6~3.3% であった。また、トリガーMRM 法及び予め作成したプロダクトイオンスペクトルのライブラリを用いることで、ライブラリマッチ度により信頼性の高い測定が可能であった。食用油中各 3-MCPD 脂肪酸エステル(200 ng/g~5000 ng/g)のライブラリマッチ度は 78~98 であった。この方法を用いることで信頼性の高い測定が可能であると考えられる。

表 4 食用油中 3-MCPD 脂肪酸エステルの定量結果

	菜種油	オリーブ油		ゴマ油	
		バージン	ピュア	焙煎	未焙煎
MLn	ND	ND	ND	ND	ND
ML	ND	ND	ND	ND	ND
MP	ND	ND	ND	ND	ND
MO	ND	ND	42(93)	ND	ND
MS	ND	ND	ND	ND	ND
DLn	ND	ND	ND	ND	ND
DL	2(36)	2(38)	18(43)	2(35)	ND
DP	2(43)	1(40)	16(42)	3(41)	ND
DO	115(71)	1(41)	1245(94)	18(42)	5(35)
DS	8(45)	4(42)	10(40)	8(39)	3(35)