

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：84421

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780140

研究課題名(和文) エステル化に基づいたMCPDおよびグリシドールの同時定量法の開発

研究課題名(英文) Simultaneous Quantification of MCPDs and Glycidol by esterification

研究代表者

佐藤 博文(Sato, Hirofumi)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・生物・生活材料研究部・研究員

研究者番号：70443546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は油脂加工品中の健康懸念物質であるモノクロロプロパンジオール類(2-MCPDと3-MCPD)とグリシドールの定量法を開発することを目的としている。本研究では、2-MCPDの合成法を開発し、これを用いて公定法中の化合物変換をNMRにより直接観測することで3-MCPD、2-MCPD、およびグリシドールのDGF公定法中の化合物変換を明らかとした。さらに、実際の油脂に既知量のグリシジル脂肪酸エステルを添加することにより、公定法処理で2-MCPDおよび3-MCPDに変換する量を定量した。その結果、グリシジルエステルを多く含む油脂はMCPDを多量に生成するため誤定量の原因となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this work is simultaneous quantification of monochloropropanediols (MCPDs) and glycidol in fats and oils of which the risks are discussed toward health. In this work, the effective gram scale synthetic method of 2-MCPD was developed and interconversions of 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol each other in the course of DGF standard method C-VI 18(10) were observed by NMR spectroscopy. Addition of glycidyl fatty acid ester into actual soybean oil sample reveals that about 95% of glycidol generated from the ester was converted into 3-MCPD and the rest of that was converted into 2-MCPD. Over-estimation could be a problem at the quantification of fat sample containing relatively larger amount of glycidol.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：モノクロロプロパンジオール グリシドール 定量 DGF定量法 2-MCPD 油脂加工品

### 1. 研究開始当初の背景

モノクロロプロパンジオール (MCPD) とグリシドール (Gly) の脂肪酸エステル類 (それぞれ MCPDE、GlyE) は食品加工における望まれない不純物である。特に、3-MCPD は生体に健康被害を及ぼす懸念から WHO より一日摂取量 (2  $\mu$ g/kg) が設定されている。わが国でも MCPDE の検出法は 2010 年度農水省リスク管理検討会により優先度 A に追加されたように重要な研究課題となっている。現在、油脂加工品中の 3-MCPDE と GlyE の直接定量は米国の ADM や我が国の花王の研究グループによって報告された LCMS を用いた手法で行われている。しかし、脂肪酸種により異なる標品が必要であることから、すべての天然油脂に対応できるわけではない。一方、3-MCPD を間接的に定量するドイツ公定法 (DGF standard methods C-III 18 option A and B (2009 年)) が提案されている (図 1)。Option A では GlyE は 3-MCPD ホウ酸エステル (3-MCPD-PhB) として検出されるのに対し、option B では Gly を除去する前処理を施すことにより 3-MCPDE のみが 3-MCPD-PhB として検出されるとされている。しかし、ドイツ公定法には以下の致命的な問題点がある。Gly と 3-MCPD の相互変換が無視されている。Option B の GlyE の除去は 100% 進行する保証が無い。最終段階の 3-MCPD-PhB への誘導体化はホウ酸エステル形成がほとんど望めない酸性条件で行われている。3-MCPD-PhB の抽出に極性化合物に対する抽出効率が最悪のヘキサンが用いられている。3-MCPDE の異性体である 2-MCPDE の検出が不可能である。GlyE の定量はできない。

一方、我々はこれらの問題点を解決するために製油企業との共同研究を行い、2011 年～ の問題点に対する回答として、in situ NMR 測定によるドイツ公定法中の Gly・3-MCPD の相互変換率を決定し、Option B の加水分解処理における系中の化合物変換、および誘導体化条件で 3-MCPD-PhB がほとんど生成していないこと、低極性のヘキサンでは抽出効率が悪いことを初めて明らかとした。さらに、その改良法として高極性有機溶媒による抽出が有効であることも明らかとしている。しかし、3-MCPD-PhB として検出を行う現公定法では 2-MCPDE の検出を行うことは不可能であり、GlyE の定量も含めて行うとなれば、異なる原理の定量法を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

油脂中の MCPD および Gly の定量分析法の改良は早期の決着が望まれることから、ここ数年で多くの研究者・企業によって精力的に研究されている。これまでに報告された定量法の中でもっとも信頼性の高いとされているのがドイツ公定法 (DGF 公定法) である。この公定法では MCPD を 3-MCPD-PhB に誘

導体化して、GC-MS で検出する。

一方で、この公定法処理中にグリシジルエステルより遊離したグリシドールが 3-MCPD に変換する懸念があり、グリシジルエステルを多く含む油脂では 3-MCPD のオーバーエスティメーションが問題となることがある。また、油脂中に微量に存在する (であろう) 2-MCPD については無視しており、完全なものととは言えない。

これらの背景を踏まえ、本研究では、2-MCPD、3-MCPD、および Gly の誘導体化に着目し、それぞれを同時に定量できる定量法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

油脂中の 2-MCPD を定量するために 2-MCPD の純物質が必要となるが、研究開始当初には販売されておらず、また、合成法に関する論文もなかった。そこで、本研究ではまず 2-MCPD のグラムスケールの合成法を開発した。

油脂中の MCPD 類とグリシドールの公定法処理による物質変換を明らかとするために、公定法条件で各物質を処理し、NMR 測定を行った。その  $^1\text{H-NMR}$  の各物質のプロトンピーク比より、処理中の物質の挙動を明らかとした。大豆油に合成したグリシジルエステルを既知量添加し、DGF 公定法処理後の各物質の量を GC-MS により定量した。

2-MCPD の定量法では本来その重水素体が必要となるが、研究開始当初は販売されていなかった。そこで本研究では 3-MCPD- $d_6$  を内部標準として複数の GC-MS 分析機器により定量とフラグメント解析を行うことにより、3-MCPD- $d_6$  を内部標準として使用可能かどうか確認した。

MCPD 類およびグリシドールをそれぞれ酢酸エステル、ブチルエステル、安息香酸エステルに誘導し、GD-FID による解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1. 2-MCPD の合成

モノクロロプロパンジオールを出発原料として 3 ステップで 2-MCPD を合成した。モノクロロプロパンジオールを水素化ナトリウムで調製したベンジルアルコキシドと反応させることによってグリセリン 1,3-ベンジルエーテルを合成した。これを減圧蒸留によって精製し、ピリジン存在下塩化チオニルと反応させることで 2 位の水酸基をクロロ化した。これを減圧蒸留によって精製し、Pd/C を触媒とした接触水素化により 1,3 位のベンジル基を除去した。得られた生成物をオープンカラムクロマトグラフィーで精製することにより、2-MCPD を 10 グラム単位で合成することができた。

#### 2. MCPD 類とグリシドールの DGF 公定法中の挙動

3-MCPD とグリシドールが酸性およびアルカリ性条件で相互に変換することは知られて

いるが、公定法の処理条件下での物質変換についての知見はなかった。DGF 公定法とは油脂をアルカリでけん化して遊離の MCPD を発生させ、硫酸で中和して中性～弱酸性としフェニルホウ酸でホウ酸エステルに誘導体化させ、これを GC-MS で検出・定量する手法である。すなわち、公定法処理中はアルカリ性と酸性の両方の液性となり、アルカリ性条件化では MCPD 類は脱塩化水素してグリシドールになる。また、グリシドールは酸性条件化で再び塩化水素付加を起こし、MCPD 類となる。本研究ではまず、2-MCPD および 3-MCPD の DGF 処理中の物質変換について NMR をもちいて直接観測を行った。

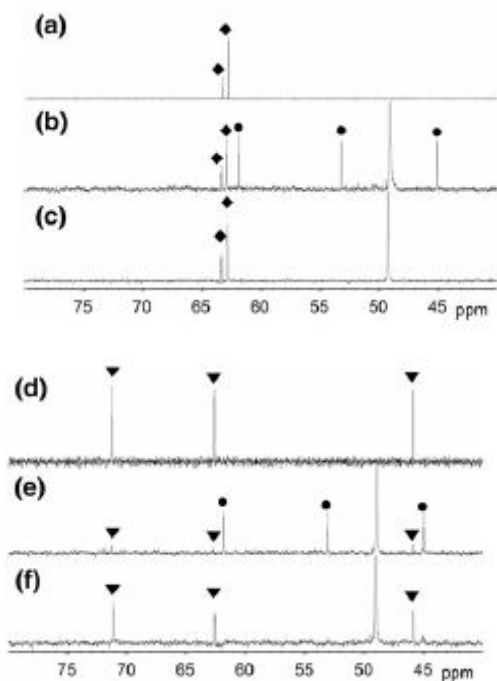


図1. 2-MCPD と 3-MCPD の DGF 処理によるスペクトル変化。●: 2-MCPD、○: 3-MCPD、△: グリシドール。(a) 2-MCPD 重水素溶液；(b) 2-MCPD の DGF アルカリ処理；(c) 2-MCPD の DGF 酸処理；(d) 3-MCPD 重水素溶液；(e) 3-MCPD の DGF アルカリ処理；(f) 3-MCPD の DGF 酸処理。

図1に示すように、2-MCPD および 3-MCPD は DGF アルカリ処理により一部がグリシドールに変換された。また、これを続く DGF 酸処理することにより元の MCPD に戻ることが明らかとなった。この一見不思議な現象についてより詳しく調べるために、2-MCPD とグリシドールの等量混合系および 3-MCPD とグリシドールの等量混合系について同様の処理を行いその生成物について確認したところ、3-MCPD とグリシドールの混合系からは 3-MCPD のみが得られたのに対し、2-MCPD とグリシドールの混合系からは 2-MCPD と 3-MCPD が 1 対 1 の割合で得られた。すなわち、化学的な機構については今のところ不明で

はあるが、公定法処理中で 2-MCPD と 3-MCPD はほとんど相互変換しないこと、グリシドールはほとんど 3-MCPD に変換することが明らかとなった。ほとんどと示した理由は NMR の感度が GC-MS 等の微量分析と比較してそれほど高くないためである。そこで、微量の相互変換についてより詳しく調べるために 2-MCPD および 3-MCPD を添加した大豆油脂試料を DGF 公定法で処理し、その生成物について調べた。

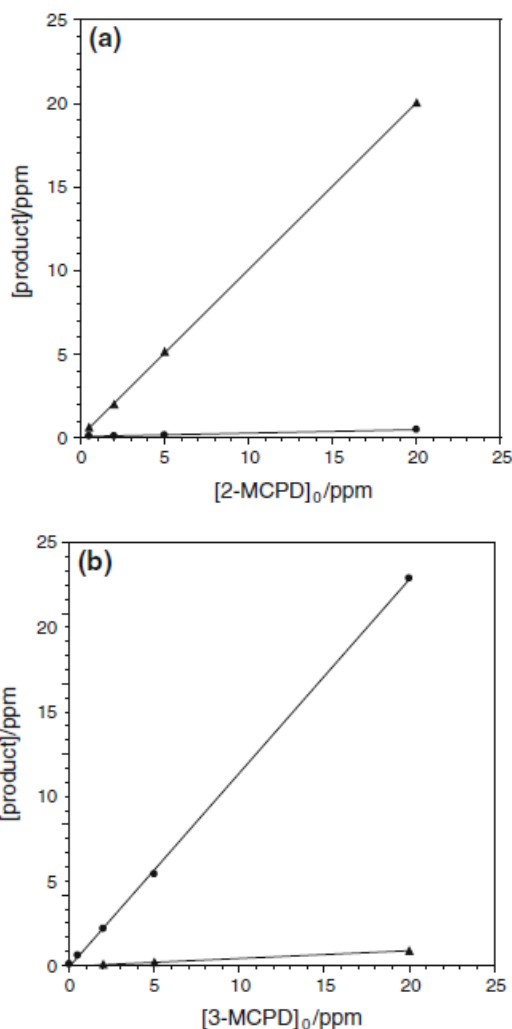


図2. (a) 2-MCPD と (b) 3-MCPD を添加した大豆油を DGF 処理した時に得られる 2-MCPD (●) と 3-MCPD (○) の量。

図2に示すように、2-MCPD、3-MCPD の両方の系で添加した量に比例して 2-MCPD と 3-MCPD が観測された。得られた検量線の傾きより 2-MCPD と 3-MCPD の生成量を計算したところ、2～4%程度の相互変換が起こっていることが明らかとなった。これらの結果より、2-MCPD と 3-MCPD はともに相互変換を起こすが、その割合は多くはなく、定量に大きな影響を与えないことが明らかとなった。

### 3. 2-MCPD の GC/MS による定量

DGF 公定法ではフェニルホウ酸エステル誘導体を検出体としている。3-MCPD では 1,2 位の水酸基と 5 員環の環状ホウ酸エステルを形成するのにに対し、2-MCPD では 1,3 位の水酸基と 6 員環の誘導体を形成するためこれらこのイオン化効率が異なり GC-MS で分析したときの挙動が異なることが予測される。GC-MS では内標と検出体のイオン化挙動が大きく異なる場合、内標として使用できない場合もあるが、図 2a に示すように直線の検量線が得られているため 2-MCPD を 3-MCPD- $d_5$  を内標として定量することは可能である。

これらの結果より、2-MCPD 誘導体 ( $m/z = 196$ ) は 3-MCPD- $d_5$  誘導体 ( $m/z = 201$ ) を内標に、3-MCPD 誘導体 ( $m/z = 147$ ) は 3-MCPD- $d_5$  誘導体 ( $m/z = 150$ ) を内標に定量できることがわかった。

GC-MS でのイオン化とフラグメンテーションの割合は質量分析計に依存するため、QP-2010 (Shimadzu 社) と ITQ1100 (Thermo 社) の二社の質量分析計を用いて分析を行い比較した。

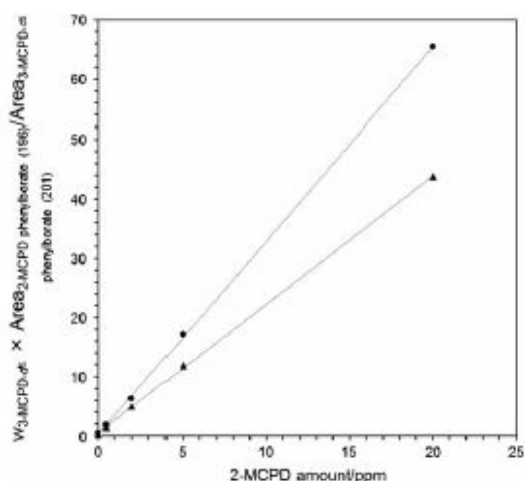


図 3. 2-MCPD の検量線。2-MCPD 誘導体 ( $m/z = 196$ )/3-MCPD- $d_5$  誘導体 ( $m/z = 201$ ) の GC ピーク エリアレシオ。 : QP-2010、 : ITQ1100。

図 3 に示すように、ともに直線検量線が得られたことから、どちらの GC-MS 分析機器を用いても定量することが可能であることがわかった。二つの分析機器間で傾きが異なり、イオン化の機構や形状によって 2-MCPD と 3-MCPD のイオン化効率に差があることがよくわかる。2-MCPD 誘導体は安定な 6 員環構造のためフラグメントを持たないが、3-MCPD 誘導体は不安定な構造のため脱クロロメチレンしたフラグメントをメインイオンとして発生する。二つの機器でことなる条件はこのフラグメント化の効率だけであるので、この 3-MCPD 誘導体/3-MCPD- $d_5$  誘導体のイオン量比を IR、見かけの 2-MCPD 誘導体/3-MCPD

誘導体の感度比 (図 3 で与えられた傾き) を SR とすると、DGF 法の定量式を以下のように改変して 2-MCPD を定量することができる。

$$w_{2-MCPD} = \frac{SF_2 \times w_{3-MCPD-d_5}}{SF_{201}} \times \frac{IR}{SR} \times \frac{SF_{1201}}{SF_{1150}} \quad (1)$$

The term  $SF_{1150}/SF_{1201}$  in Eq. 1 is the observed fragmentation efficiency. So,

$$w_{2-MCPD} = \frac{SF_2 \times w_{3-MCPD-d_5}}{CC \times SF_{1150}} \quad (2)$$

where  $w_{2-MCPD}$  is the mass fraction, in mg/kg, of 2-MCPD;  $w_{3-MCPD-d_5}$  is the mass fraction, in mg/kg, of 3-MCPD- $d_5$ ;  $SF_{1201}$  is the area of 3-MCPD- $d_5$  ( $m/z = 201$ );  $SF_{1150}$  is the area of 3-MCPD- $d_5$  ( $m/z = 150$ );  $SF_2$  is the area of 2-MCPD ( $m/z = 196$ );  $SR$  in Eq. 1 is the sensitivity ratio of 2-MCPD phenylborate to 3-MCPD phenylborate (the slope of the calibration curve in Fig. 6) obtained using our GC/MS instrument (see Table 2);  $IR$  in Eq. 1 is the ion-ratio of the fragment to the precursor of 3-MCPD- $d_5$  phenylborate obtained using our GC/MS instrument (see Table 2); and  $CC$  in Eq. 2 is a correction constant ( $0.65 \pm 0.01$ ).

#### 式 1. 2-MCPD の定量式。

式 1 をまとめると式 2 になり、 $IR/SR$  は機器によらず一定であるため、これを  $1/CC$  ( $0.66$ ) の定数として取り扱うことができる。この式を用いれば、2-MCPD を 3-MCPD- $d_5$  を内標として定量することができるだけでなく、過去に測定したチャートからもさかのぼって 2-MCPD 量を定量することができる。

#### エステル化による定量

ここまでの研究で、2-MCPD および 3-MCPD はホウ酸エステルに誘導体化することにより定量できることが分かった。この科研費期間内に競合する研究チームによって、グリシドールをモノプロモプロパンジオール誘導体に選択的に誘導体化して定量する手法が報告された。これらを合わせると、2-MCPD、3-MCPD、グリシドールのすべてを DGF 公定法で定量することができるようになった。

一方で、DGF 公定法は感度の高い GC-MS 検出を行っているものの、形成効率の悪いホウ酸エステルへ誘導体化が必要であることが弱点となっている。そこで本研究では、共有結合であるカルボン酸エステルへ誘導体化して、より安価で一般的な機器である GC-FID で検出することを目的として研究を進めた。MCPD 類およびグリシドールをピリジン中酸無水物と反応させることで、酢酸エステル、 $n$ -ブチルエステル、安息香酸エステルを調製した。これらを微極性カラム Shimadzu DB-5 で分析したところ、安息香酸エステルでより分離が観測されたことものの、10 ppm のオーダーが検出限界であった。現在 GC-MS の検出限界の 100 ppb に及ばないため、DGF 公定法を改良するのが最適であると考えられる。

## 結論

以上、本研究では 2-MCPD の大量合成法を開発し、2-MCPD の定量が 3-MCPD- $\alpha_5$  を内標として用い DGF 公定法の改良で行えることを示した。また、グリシドール脂肪酸エステル の公定法での化合物変換を明らかとし、脂肪酸種にかかわらず約 5% 程度の 2-MCPD を生成することを明らかとした。

また、2-MCPD、3-MCPD、グリシドールの DGF 公定法処理条件中での化合物変換について NMR スペクトルを用いて直接的に観測し、2-MCPD および 3-MCPD は公定法中で一度グリシドールに変換されるものの、誘導体化の段階でほとんど元の異性体に回復することから、図 4 の化合物変換図に示すように、2-MCPD と 3-MCPD そのものにはほとんど誤定量の心配はないことを明らかとした。

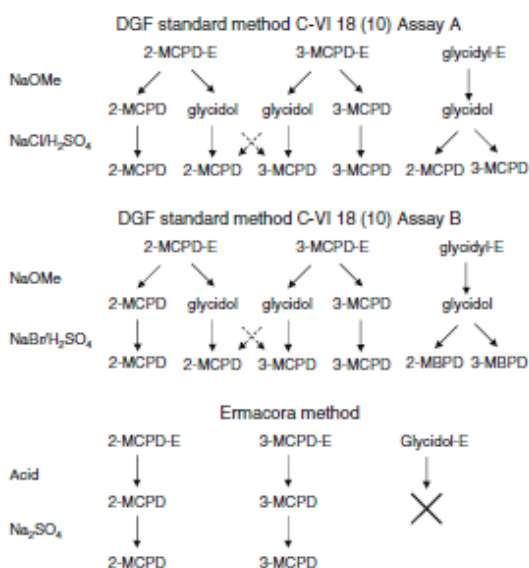


図 4. DGF 公定法中の化合物変換。

一方で、グリシドールはそのほとんどが 3-MCPD に変換されるため、グリシドールを大量に含む油脂の分析にはオーバーエスティメーションの危険があることを明らかとした。近年ではこのオーバーエスティメーションの問題を解決するために、あらかじめ油脂を脱塩し、酸性条件でエステル交換する行程 (Ermacora method) や、あらかじめグリシドールを臭化ナトリウムで処理することによって 3-MBPD に誘導する行程 (assay B や Kuhlman method) も開発されてきている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. A Chemical Approach to Searching Bioactive Ingredients in Cigarette Smoke  
Y. Takahashi, S. Horiyama, C. Honda, K.

Suwa, K. Nakamura, M. Kunitomo, S. Simma, M. Toyoda, H. Sato, M. Shizuma, M. Takayama  
*Chem Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 85-89.

2. 2-Monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) Dynamics in DGF Standard Methods and Quantification of 2-MCPD

H. Sato, N. Kaze, H. Yamamoto, Y. Watanabe  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90*, 1121-30.

[学会発表](計 14 件)

1. DGF C-VI 18 (10) 公定法中のモノクロロプロパンジオール-グリシドール相互変換の直接観測

佐藤博文、風直樹、山本浩志、小野大助、静間基博、渡辺嘉

日本油化学会フレッシュマンサミット OSAKA、2012 年 11 月 11 日、近畿大学

2. Dynamics of 3-MCPD and glycidol in the process of DGF Standard Methods

H. Sato, N. Kaze, H. Yamamoto, D. Ono, M. Shizuma, T. Nagao, Y. Watanabe

World Congress on Oleo Science and 29<sup>th</sup> ISF Congress - JOCS/AOCS/KOSC/ISF Joint Meeting -, 2012 年 10 月 2 日、アルカス佐世保

3. 鎖長制御された EO 鎖を有する界面活性剤の物性

稲本正、小野大助、静間基博、川崎英也、荒川隆一、佐藤博文

日本油化学会フレッシュマンサミット OSAKA、2012 年 11 月 11 日、近畿大学

4. 光学活性銅錯体のアミノ酸に対する光学異性体識別能：マスペクトル法によるアプローチ

中小路崇、佐藤博文、小野大助、三宅弘之、筑部浩、稲本正、川崎英也、荒川隆一、静間基博

日本油化学会フレッシュマンサミット OSAKA、2012 年 11 月 11 日、近畿大学

5. Synthesis and Properties of Chemocleavable Nonionic Surfactants Derived from Diethyl Tartrate

D. Ono, T. Nakagawa, H. Sato, M. Shizuma, A. Masuyama

World Congress on Oleo Science and 29<sup>th</sup> ISF Congress - JOCS/AOCS/KOSC/ISF Joint Meeting -, 2012 年 10 月 2 日、アルカス佐世保

6. A search for active ingredients in cigarette smoke that modify significant biomolecules

S. Horiyama, C. Honda, K. Suwa, K. Nishide, Y. Takahashi, K. Nakamura, M. Kunitomo, H. Sato, M. Shizuma, M. Takayama

19th International Mass Spectrometry

Conference (IMSC2012)、2012年9月20日、  
京都国際会議場(京都市)

7. 光学活性四座配位子を有する銅錯体への  
エナンチオ選択的錯形成挙動

中小路崇、佐藤博文、三宅弘之、川崎英也、  
小野大助、荒川隆一、築部浩、静間基博  
第23回基礎有機化学討論会、2012年9月19  
日、京都テルサ(京都市)

8. Enantioselective binding  
characteristics of amino acid to chiral  
copper(II) complex using electrospray  
ionization mass spectrometry coupling  
with the deuterium-labeled method

T. Nakakoji, H. Sato, H. Miyake, H.  
Kawasaki, R. Arakawa, D. Ono, M. Shizuma  
19th International Mass Spectrometry  
Conference (IMSC2012)、2012年9月18日、  
京都国際会議場(京都市)

9. Mass spectrometric approaches to  
enantioselective complexation system in  
solution

M. Shizuma, H. Sato, (T. Nakakoji, H.  
Kawasaki, K. Asano, T. Matsuzaki, T.  
Suzuki, K. Hirose, Y. Tobe, R. Arakawa),  
D. Ono

19th International Mass Spectrometry  
Conference (IMSC2012)、2012年9月18日、  
京都国際会議場(京都市)

10. MCPD/グリシドール類低減のための油脂  
脱臭行程前処理法およびブタ腓臓リパーゼ  
の2-MCPDエステル水解能

風直樹、渡辺嘉、佐藤博文、山本浩志  
日本油化学会第52回年会、2013年9月11日、  
東北大学

11. DART-MS を用いた脂質・脂質誘導体の分  
析

佐藤博文、渡辺嘉、渡辺淳、松本恵子、塩田  
晃久、戸田晋吾  
日本油化学会第52回年会、2013年9月11日、  
東北大学

12. Interconversion Between  
Monochloropropanediol and Glycidol in the  
Course of DGF Standard Method C-VI 18 (10)

Hirofumi Sato, Naoki Kaze, Hiroshi  
Yamamoto, Daisuke Ono, Motohiro Shizuma,  
Yomi Watanabe

13. 固相単体を用いたエチレンオキシド鎖  
を親水部に有するノニオン界面活性剤の鎖  
長制御合成

稲本正、小野大助、静間基博、川野真太郎、  
川崎英也、荒川隆一、佐藤博文

日本油化学会第52回年会、2013年9月11日、  
東北大学

14. 光学活性四座配位子 銅錯体によるア  
ミノ酸に対するキラル認識挙動

中小路崇、静間基博、三宅弘之、川崎英也、  
小野大助、荒川隆一、築部浩、佐藤博文  
第10回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、  
2013年5月25日、和歌山大学

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤博文(SATO, Hirofumi)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研  
究員

研究者番号: 70443546

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし