



Title	超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた パーム油脂中クロロプロパノール脂肪酸エステル類精 密プロファイリング技術の開発
Author(s)	堀, 遂人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/59608">https://doi.org/10.18910/59608</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 博士学位論文

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を  
用いたパーム油脂中クロロプロパノール脂肪酸  
エステル類精密プロファイリング技術の開発

堀 遂 人

2016年7月

大阪大学大学院工学研究科  
生命先端工学専攻 生物工学コース  
生物資源工学領域



## 目次

第一章. 緒論.....	3
1-1. はじめに .....	3
1-2. パーム油脂.....	3
1-3. クロロプロパノール脂肪酸エステル .....	6
1-4. これまでの CPFAEs に関する研究とその課題 .....	8
1-5. CPFAEs 分析系.....	10
1-6. 超臨界流体クロマトグラフィー .....	16
1-7. 本研究の目的 .....	20
第二章 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた CPFAEs 精密分析系 の開発.....	21
2-1. 緒言.....	21
2-2. 実験方法 .....	22
2-2-1. 試薬.....	22
2-2-2. CPFAEs スクリーニングに用いた油脂サンプル.....	22
2-2-3. 油脂サンプルの加熱処理方法.....	23
2-2-4. CPFAEs スクリーニングに用いた LC/TOF MS の分析条件 .....	23
2-2-5. CPFAEs の定量に用いた SFC/MS の分析条件.....	24
2-2-6. 添加回収試験 .....	25
2-3. 結果・考察.....	26
2-3-1. LC/TOF MS を用いた分析対象化合物の選定 .....	26
2-3-2. 三連四重極型質量分析計の分析条件検討 .....	29
2-3-3. SFC を用いた CPFAEs の分離条件検討.....	30
2-3-4. 構築した分析系の性能検証 .....	42

2-4. 小括 .....	43
第三章. 油脂中の CPFAEs 分析による構築した分析系の有用性の検証 .....	45
3-1. 緒言 .....	45
3-2. 実験方法 .....	46
3-2-1. 試薬 .....	46
3-2-2. CPFAEs の定量を行った油脂サンプル .....	46
3-2-3. 油脂サンプルの加熱処理 .....	47
3-3. 結果・考察 .....	48
3-3-1. 油脂サンプルの加熱処理法の構築 .....	48
3-3-2. 単一の脂質から生成する CPFAEs の評価 .....	50
3-3-3. パーム油脂から生成する CPFAEs の評価 .....	55
3-4. 小括 .....	58
第四章 総括 .....	59
謝辞 .....	64
引用文献 .....	66
本学位論文に関与する論文 .....	76
その他原著論文 .....	77
学会発表 .....	78



## 略号

SFC ; Supercritical fluid chromatography

SFC/MS ; Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry

SFC/QqQ MS ; Supercritical fluid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry

GC/MS ; Gas chromatography/ Mass spectrometry

LC ; Liquid chromatography

LC/TOF MS ; Liquid chromatography/time of flight mass spectrometry

LC/QqQ MS ; Liquid chromatography/ triple quadrupole mass spectrometry

MRM ; Multiple reaction monitoring

CID ; Collision Indusion Detection

CP ; Chloropropanol

CPFAE ; Chloropropanol fatty acid ester

MAG ; Monoacylglycerol

DAG ; Diacylglycerol

TAG ; Triacylglycerol

ODS ; Octa Decyl Silyl

POHCl ; *rac*-1-palmitoyl-3-chloropropanediol

OHPCl ; *rac*-2-palmitoyl-3-chloropropanediol

PCIOH ; *rac*-1-palmitoyl-2-chloropropanediol

OOHCl ; *rac*-1-oleoyl-3-chloropropanediol

OHOC1 ; *rac*-2-oleoyl-3-chloropropanediol

OCIOH ; *rac*-1-oleoyl-2-chloropropanediol

PPCl ; *rac*-1,2-di palmitoyl-3-chloropropanediol

PCIP ; 1,3-di palmitoyl-2-chloropropanediol

OOCl ; *rac*-1,2-di oleoyl-3-chloropropanediol

OCIO ; 1,3-di oleoyl-2-chloropropanediol

PLCl ; *rac*-1-palmitoyl-2-linoreoyl-3-chloropropanediol

PSCl ; *rac*-1-palmitoyl-2-stearoyl-3-chloropropanediol

OLCl ; *rac*-1-oleoyl-2-linoreoyl-3-chloropropanediol

PPCl-d5 ; *rac*-1,2-di palmitoyl-3-chloropropanediol-d5

POCl ; *rac*-1-palmitoyl-2-oleoyl-3-chloropropanediol

SOCl ; *rac*-1-stearoyl-2-oleoyl-3-chloropropanediol

## 第一章. 緒論

### 1-1. はじめに

本章では、本研究の背景，目的について述べる．まずはじめに，パーム油脂及び分析対象化合物であるクロロプロパノール脂肪酸エステル の概論について述べる．本概論の中で，クロロプロパノール脂肪酸エステルがなぜ注目されているのかについても併せて解説する．続いて，クロロプロパノール脂肪酸エステルに関する研究の現状，及び問題点について述べ，最後に，本研究の目的を説明する．

### 1-2. パーム油脂

ヤシ科アブラヤシ属に属するギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)，アメリカアブラヤシ (*Elaeis oleifera*) の果実には脂質が豊富に含まれており，それらを搾油することによって得られる油脂がパーム油脂である．パーム油脂の主要構成脂肪酸は，オレイン酸，パルミチン酸，リノール酸，ステアリン酸の 4 種であり，その割合は表 1 の通りである．また，飽和脂肪酸が約 49% 含有されており，融点が高く常温で固体である (1)．

表 1 パーム油脂中の構成脂肪酸

構成脂肪酸	(%)
パルミチン酸	43.5
ステアリン酸	4.3
オレイン酸	36.6
リノール酸	9.1

パーム油脂は、分別や硬化等の加工工程を経ることで、融点や結晶性等の物性を任意に変化させることができる。そのためパーム油脂は、石鹼や潤滑油等の工業用途だけでなく、フライ油、マーガリン、ショートニング、チョコレート用油脂等の食用油脂としても利用されている。そのためパーム油脂は、2013-14年では全世界で 5800 万トン生産され、現在世界で最も生産されている油脂源となっている (2)(表 2)

表 2 主要油脂の生産量

	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
パーム油	44586	46421	49516	52466	55947	58462
大豆油	35997	38866	41345	42215	42140	43782
菜種油	21412	23958	24059	24434	25035	25687
ひまわり油	12818	12631	12400	15259	13571	15637
綿実油	4822	4451	4793	5146	4994	4860
落花生油	4313	4134	4270	4098	3856	4107
とうもろこし油	2305	2389	2526	2690	2898	2999
オリーブ油	2888	3298	3384	3630	2586	3440
ヤシ油	3099	3621	3090	3123	3451	3210

(千トン)

搾油されたパーム油脂はカロテノイドを豊富に含んでおり、そのままでは食用に適さない。そのため搾油されたパーム油脂 (パーム原油 ; Crude Palm Oil) は精製工程を経ることで、その商品価値を高めている (図 1)。パーム油の精製工程は主に脱ガム、脱酸、脱色、脱臭の 4 つの操作にて構成されている (3)(図 2)。まず脱ガム操作では、搾油された Crude Palm Oil を 60°C に加温した後、リン酸等の酸を加え攪拌を行う。攪拌後、温水を添加し Crude Palm Oil を洗浄する。本操作により、リン脂質やテルペノイドから成る不ケン化物が除去される。続く脱酸操作では、アルカリを用いて油脂中に存在している遊離脂肪酸を

石鹼にし、油脂から除去する。脱色操作では、活性白土を用いて油脂中の色素成分を除去する。パーム油脂はカロテノイドを豊富に含んでいる為、搾油直後の色調は赤い。脱色操作ではこのカロテノイドを油脂から除去する。最後に脱臭操作では、減圧、高温下においた油脂に水蒸気を吹き込み、脱酸操作で取り除けなかった遊離脂肪酸や香気成分の除去を行う。一般的な脱臭操作時の脱臭装置内の圧力は 2-5 mmHg 以下であり、温度は 230-260℃とされている (3-5)。以上の精製工程を経ることで品質が安定し、無味・無臭の良質なパーム油脂を得ることができる。

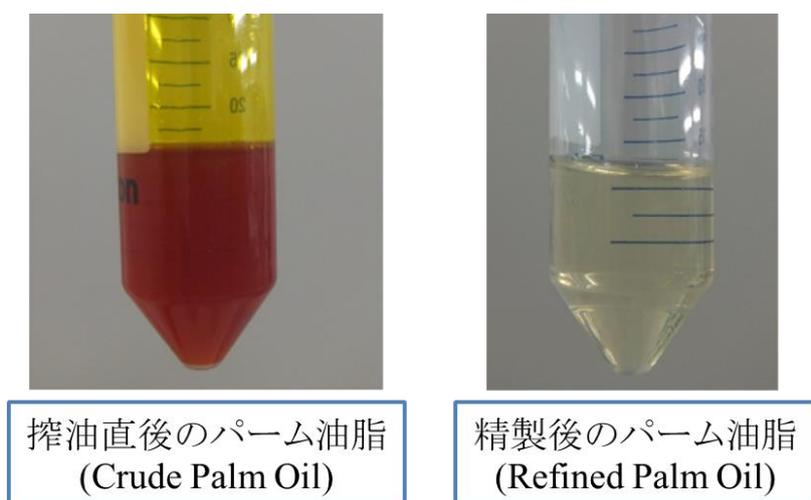


図 1 精製前後でのパーム油脂の外観

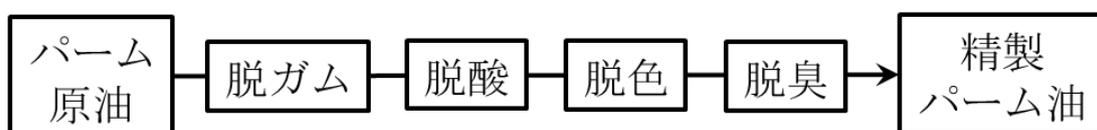


図 2 パーム油脂の精製工程

### 1-3. クロロプロパノール脂肪酸エステル

クロロプロパノール脂肪酸エステル (Chloropropanol Fatty Acid Ester ; CPFAE) とは、3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD), 2-chloropropane-1,3-diol (2-MCPD), 1,3-dichloropropanol (1,3-DCP), 2,3-dichloropropanol (2,3-DCP) に脂肪酸が1つないし2つエステル結合した化合物である (図 3). CPFAEs の脂肪酸が結合していない Chloropropanol (CP) については、1970年代に植物性たん白を塩酸で加水分解して製造されるたん白加水分解物 (Hydrolyzed Vegetable Protein) においてその存在が確認された (6). これは、原料である植物性たん白中のリン脂質等の残存脂質が、塩酸と高温で反応して生成されることが知られている (6). この製造工程において 3-MCPD の他にも、1,3-DCP も微量ではあるが生成される. このように、CP については過去から一部の食品中でその存在が確認されていた. そして 2007年、ドイツ連邦リスク評価研究所 (Bundesinstitut für Risikobewertung; BfR) はパーム油脂を原料にした育児粉乳中に、3-MCPD 脂肪酸エステル及びその位置異性体である 2-MCPD 脂肪酸エステルが存在していると報告した (7). 各食用油脂中の CPFAEs をモニタリングした結果、CPFAEs は精製パーム油脂中に比較的高い濃度で存在していることが明らかになった (表 3) (8-12).

併せて、CPFAEs の毒性に関する研究も行われた. Liu らはパルミチン酸が一つ、ないし二つ結合した CPFAEs をマウスに経口摂取させ CPFAEs の毒性評価を行った. その結果、パルミチン酸が一つ結合した CPFAEs の LD 50 は 2676.81 mg/kg とされ、パルミチン酸が二つ結合した CPFAEs の場合は、LD 50 は 5000 mg/kg と結論付けた (13). このように、一部の研究グループが CPFAEs の毒性に関する研究を行っているが (14, 15), 現在ある報告のみで CPFAEs の毒性に関する評価を結論付けるには知見が少ないとされており、後述する CODEX や EFSA が CPFAEs に関する研究を推奨しているのが現状である.

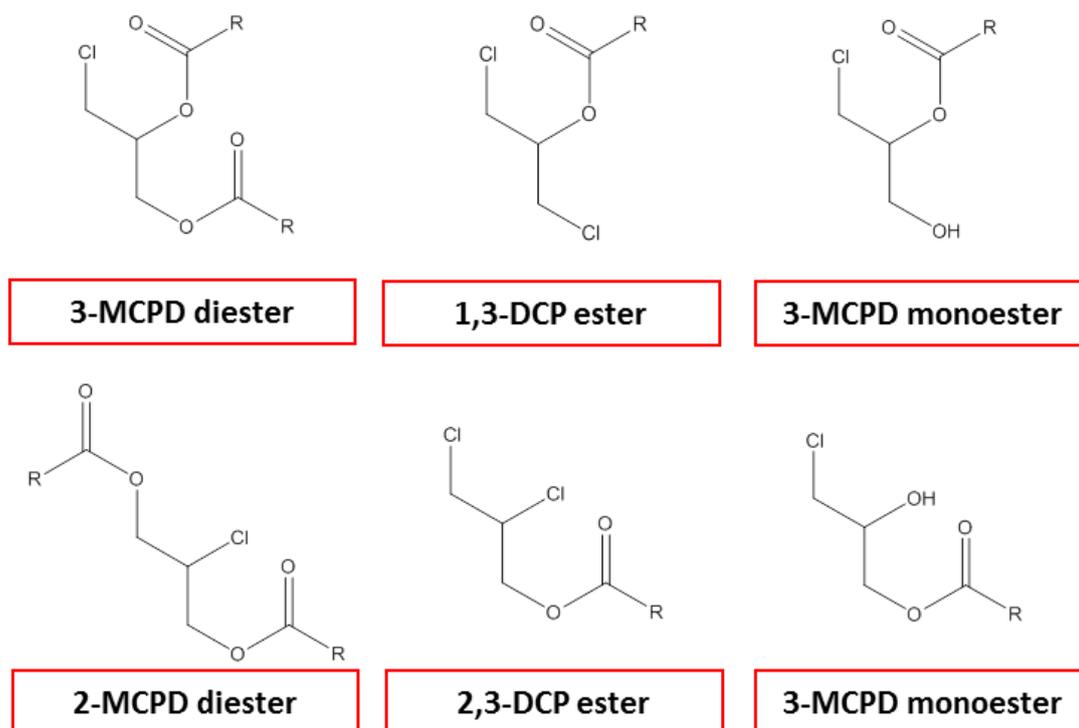


図 3 CPFAEs の構造

表 3 各食用油脂に存在している CPFAEs 量 (9)

	試料 点数	定量限界 未満の点数	最小値	最大値	平均値
パーム油	5	0	2.8	3.8	3.3
亜麻仁油	1	1	< 0.3	< 0.3	0.0
オリーブ油	5	5	< 0.3	0.4	0.1
エキストラバージンオリーブ油	5	2	< 0.3	< 0.3	0.0
ココヤシ油	3	3	< 0.3	0.3	0.2
ごま油	20	20	< 0.3	< 0.3	0.0
こめ油	24	0	0.3	1.0	0.5
紅花油	4	3	< 0.3	0.3	0.1
大豆油	3	3	< 0.3	< 0.3	0.0
とうもろこし油	12	8	< 0.3	0.9	0.2
菜種油	4	4	< 0.3	< 0.3	0.0
ひまわり油	4	4	< 0.3	< 0.3	0.0

(mg/kg)

本報告を受けて、CODEX 委員会食品汚染物質部会は 2008 年、3-MCPD 脂肪酸エステルを汚染物質及び毒素の優先評価リストに掲載することで合意した (16). 一方、EFSA (European Food Safety Authority) 科学委員会は 2009 年、3-MCPD 脂肪酸エステルに関する調査研究を共有するためにデータベースを開設した. さらに CPFAEs のヒトの健康に対するリスク評価を行う為に、3-MCPD 脂肪酸エステルに関する動態研究を推奨している (17). 日本国内においても、農林水産省が食品安全行政を推進するうえで必要な基礎的知見を充実するため、食品中の 3-MCPD 脂肪酸エステルの低減法開発及び食品中の 3-MCPD 脂肪酸エステルの分析法開発に関する研究の推進を求めている (18). 以上のように、食品中の CPFAEs 量の規格化を念頭に置いた措置が、日本を含めた世界各国で実施されている. CPFAEs に関する規格が設定される前に、食品中、特にパーム油脂中の CPFAEs の実態把握及び低減法開発が求められた.

#### 1-4. これまでの CPFAEs に関する研究とその課題

これまでに多くの研究グループが、CPFAEs に関する研究を行ってきた. Franke らは、CPFAEs の一種である 3-MCPD 脂肪酸エステルは、パーム油脂精製工程中で高温、真空化で水蒸気蒸留を行う脱臭操作にて主に生成されることを見出した (19). さらに、3-MCPD 脂肪酸エステルは、脂質を塩素化合物と共存させ、高温に供することで生成することが明らかになった (20-23). 一方で Nagy らは、パーム原油中には  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  といった無機塩素化合物のほかに、様々な有機塩素化合物が存在していると報告している (24). 以上の研究の結果から、CPFAEs は食用油脂の製造工程中で生成し、さらに CPFAEs は脂質と塩素化合物が高温条件下で反応することによって生成することが明らかになった.

上記の結果を踏まえて、Crude Palm Oil から塩素化合物を取り除くことにより、生成する CPFAEs 量の低減が試みられた。Matthäus ら (25) 及び Craft ら (26) は、Crude Palm Oil を精製工程に供する前に、水もしくはエタノールでパーム原油を洗浄することで、Crude Palm Oil 中に存在している無機塩素化合物または親水性の有機塩素化合物の除去を行った。Crude Palm Oil の洗浄の結果、精製工程後に生成する CPFAEs 量は、洗浄を実施しない場合と比較して約 20-30% 減少した。このように、塩素化合物の除去による CPFAEs 低減は一定の効果を示したが、さらなる低減を実現するためには、塩素化合物の除去とは異なる思想の手法による低減が必要であった。そのためには、CPFAEs の前駆体の把握、及び CPFAEs に至るまでの生成機構に関する詳細な知見を得ることが求められた。

CPFAEs の生成に関しては、これまで複数の報告が存在する。清水らは、mono acyl glycerol (MAG), di acyl glycerol (DAG), tri acyl glycerol (TAG) の各脂質に塩素化合物として Tetra butyl ammonium chloride を添加し 240°C で加熱後、生成した CPFAEs の定量を GC/MS にて実施している (21)。ただし本研究では、分析前に CPFAEs に結合している脂肪酸を加水分解し、遊離した CP の内 3-MCPD のみを定量している。一方で、Destailats らも同様の研究を行っている (27)。彼らは MAG, DAG, TAG に塩素化合物として FeCl<sub>2</sub> 及び lindane を添加し、235°C で加熱後、生成した CPFAEs の定量を LC/MS にて実施している。本研究では、脂肪酸の加水分解は実施せず分析が行われているが、分析対象化合物は mirystic acid, palmitic acid, oleic acid, heptadecanoic acid を脂肪酸側鎖に持った CPFAEs のみである。このように、これら研究の中では 2-MCPD, 1,3-DCP, 2,3-DCP の各脂肪酸エステルが未評価であり、3-MCPD についても全ての脂肪酸分子種が評価されていない。よって、得られた知見は限定的なものであった。

CPFAEs 生成に関する詳細な知見を得るためには、パーム油脂中の CPFAEs を精密に評価できる分析系が求められた。

### 1-5. CPFAEs 分析系

CPFAEs 分析系として、これまでに複数の研究グループが CPFAEs に結合している脂肪酸を加水分解し、生じた遊離体を GC/MS にて定量する手法について開発を行っている (28-38)。これらの手法は、油脂中に存在している CPFAEs の総量を把握することができるため、油脂中の CPFAEs の実態調査に主に用いられている。

GC/MS を用いた手法は、加水分解の手法の違いにより複数種類報告されている。まず初めに開発された手法は、WeiBhaar らにより報告された手法である (28)。本手法はナトリウムメトキシドを使用して加水分解を行い、生じた遊離体をフェニルボロン酸にて誘導体化した後、GC/MS を用いて定量を行う (図 4) (28)。ただし本手法では、食塩水を用いて塩析を行う際にグリシドールから 3-MCPD が生じる。グリシドールとは、2,3-epoxy-1-glycerol のことであり、グリセロール骨格内にエポキシ環を有した化合物である。食用油脂では、このグリシドールに脂肪酸がエステル結合したグリシドール脂肪酸エステルが存在することが報告されている (39)。グリシドール脂肪酸エステルは、油脂中の MAG や DAG が高温にさらされることで生成することが明らかになっており、油脂の精製における脱臭工程で生成するとされている (40)。グリシドール脂肪酸エステルは精製後のパーム油脂中に 0.1-数 ppm 程度存在している (39)。そのため、WeiBhaar らにより報告された手法 (28) を用いた場合、3-MCPD 脂肪酸エステルとグリシドール脂肪酸エステルの合算値が得られることになり、本手法を用いた 3-MCPD 脂肪酸エステルの正確な定量は行うことができなかった。よって

改良法として、グリシドールのエポキシ環を開環し、生じた水酸基をプロピル化することで、塩析におけるグリシドールから 3-MCPD への変換を防ぐ手法が開発された (図 5)(29)。以上の 2 種の手法は共に複数の研究機関間での妥当性試験が実施された後、DGF standard method として登録され、現在では CPFAEs の評価を行う際に最も一般的に使用されている手法となっている。一方で、宮崎らが報告した手法では、リパーゼを用いて加水分解を行っている (30)。本手法も複数の研究機関間での妥当性試験が実施され、その正確性が確認された分析法である (31)。

これら GC/MS を使用した分析系は前述の通り、油脂中に存在している CPFAEs の総量を把握できることが利点である。しかし CPFAEs の脂肪酸を加水分解する為、油脂中の CPFAEs の存在形態を把握することができない。CPFAEs の生成に関する知見を得るためには、加水分解を行わず CPFAEs の脂肪酸分子種を個々に定量出来る分析系が求められた。

**Step 1**  
ナトリウムメチラートにて加水分解

**Step 2**  
食塩水を添加

**Step 3**  
フェニルホウ酸にて誘導体化

**Step 4**  
GC/MSにてCPFAEsを定量

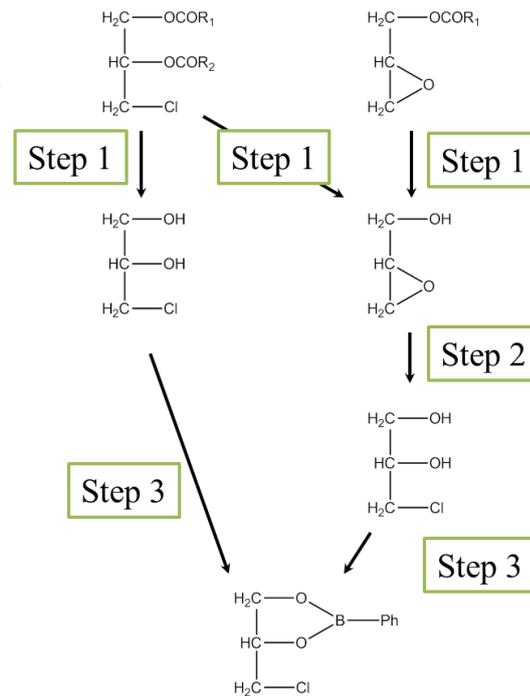


図 4 DGF standard method (assay A) のスキーム

**Step 1**  
硫酸/n-プロパノール溶液による  
エポキシ環開環

**Step 2**  
ナトリウムメチラートにて加水分解

**Step 3**  
食塩水添加

**Step 4**  
フェニルホウ酸にて誘導体化

**Step 5**  
GC/MSにてCPFAEs 定量

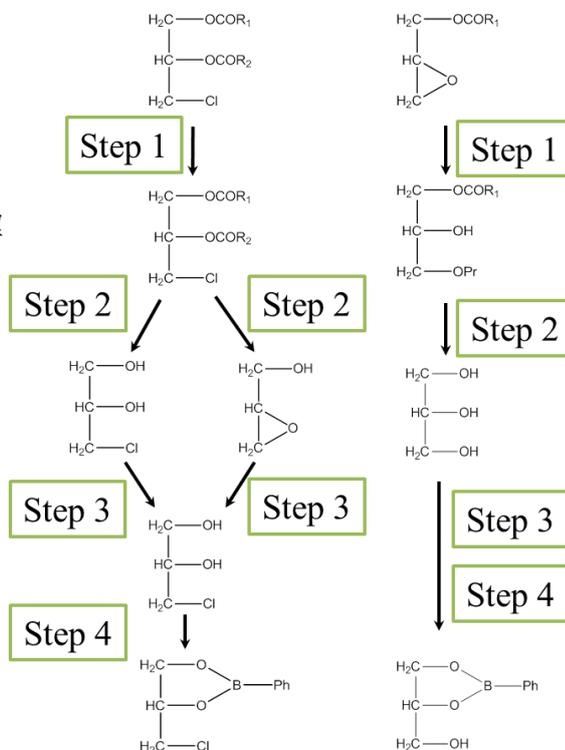


図 5 DGF standard method (assay B) のスキーム

CPFAEs の脂肪酸分子種を個々に定量出来る分析系は、逆相 LC を分離系に据えた LC/MS が分析装置として用いられた。初めに Haines らが、イオン化法として エレクトロスプレーイオン化法 (Electro Spray Ionization; ESI) を用いた LC/ESI MS を分析装置として、CPFAEs の脂肪酸分子種を個々に分析する手法を構築した (41)。ただし彼らが構築した手法は、油脂を有機溶媒に希釈するのみで分析を実施していた。また CPFAEs は ESI においてナトリウム付加体を形成しやすいという性質を有している。そのため移動相には、検出感度向上の為添加剤として不揮発性の塩であるギ酸ナトリウムを使用していた。ESI は質量分析計の試料導入部で脱溶媒を行うが、不揮発性の塩を添加剤に使用した場合、揮発しない塩が質量分析計の試料導入部に析出する。析出し試料導入部に堆積した不揮発性の塩は、質量分析計の検出感度低下を招く原因となる。以上のように本分析系は分析装置に大きな負荷をかけるものであり、サンプル中の TAG 等の低極性化合物や不揮発性の塩によるカラムや質量分析装置のインターフェースの汚染の結果、連続してサンプルを分析することができなかった。以上の問題点を踏まえ、以後報告された分析系では、油脂は固相抽出を用いて低極性の夾雑物の除去を行い、移動相には揮発性の塩であるギ酸アンモニウムが使用されるようになった。

固相抽出を用いたサンプルの精製と揮発性の塩を使用した分析系は、これまでに複数報告されている (42-47)。山崎ら (42) と Dubois ら (43) は、二種類の固相抽出法を用いて、サンプルの精製を行っている。一つは C18 カートリッジとシリカゲルカートリッジを用いて精製を行う手法で、CP 脂肪酸モノエステルを分析する際に用いられる。他方はシリカゲルカートリッジのみを用いる手法で、こちらは CP 脂肪酸ジエステルを分析する際に用いられる手法である。二種類の固相抽出法を用いるのは、CP 脂肪酸モノエステルと CP 脂肪酸ジエ

ステルの極性が大きく異なり，単一の固相抽出法で夾雑物を除去したうえで CP 脂肪酸モノエステルとジエステル両方を回収することが困難であったためである．

一方で MacMahon らは，固相抽出だけでなく分離条件についても CP 脂肪酸モノエステルを分析する手法 (44) と，CP 脂肪酸ジエステルを分析する手法 (45) をそれぞれ考案した．分離系においても CP 脂肪酸モノエステル，ジエステルそれぞれに特化した条件に設定することにより，各ピークの分離かつ形状が良好になり，60 ng/g 以下の検出感度を有した分析系を構築することができている．このように，固相抽出法を用いることでサンプルから低極性の夾雑物である TAG を除去することにより，サンプルによる質量分析計の汚染を低減させている．その結果，検出感度向上に加え，連続でサンプルの分析を行うことができる．

LC/ESI MS を分析装置として用いた分析系では，CPFAEs の脂肪酸分子種を個々に評価できることが利点である．ところが，CPFAEs の内，脂肪酸が 1 つ結合したモノエステルと，脂肪酸が 2 つ結合したジエステルでは，その極性が大きく異なるため，逆相 LC では単一の分析系で良好に分析を行うことは困難であった．例えば，各ピークの形状を良好にしようとした場合，モノエステル各分子種，及びジエステル各分子種の分離が不十分となってしまう．反対に，モノエステル各分子種，及びジエステル各分子種をそれぞれ良好に分離しようとした場合，溶出ピークがブロードになる．加えて，固相抽出によるサンプルの精製も，モノエステルとジエステルの極性が大きく異なるために 2 種類の抽出法を用いる必要があった．さらに，固相抽出を用いることで，定量結果の再現性が悪化するという問題も抱えていた．

また，サンプルの希釈溶媒の組成についても問題になる．LC にて分析を行う

際は、一般的にサンプルの希釈溶媒の組成は LC 移動相の初期溶媒組成と同じか、もしくは溶出力の弱い溶媒組成にすることが望ましいとされている。上記の条件でない希釈溶媒を使用した場合、つまり、移動相の食溶媒組成よりも溶出力の強い希釈溶媒を使用した場合、分析対象化合物がカラムの固定相に保持されない。その結果、ピークがブロードになる。加えて、分析対象化合物がカラムの導入部で濃縮されないため、検出感度の低下を招くことになる。LC を分離系に使用した CPFAEs 分析系では、移動相の初期溶媒はメタノール、アセトニトリル、水を任意の割合で混合した組成であるのに対し、サンプルの希釈溶媒にはイソプロパノールやジクロロメタン等が使用されてきた。CPFAEs の内、CP ジエステルはメタノールやアセトニトリルには溶解しない為、上記のような組成の希釈溶媒を使用せざるを得ない。このように、サンプルの希釈溶媒の組成と LC の移動相の組成のギャップが生じ、ピークの形状の悪化を引き起こしている。

2011 年に初めて報告されてから改良がおこなわれてきた LC/ESI MS による CPFAEs 分析法であるが、上記のような LC の原理上克服することのできない問題点を残したままとなっている。このような問題点を解決するためには、LC とは異なる手法による分離法が必要であった。

	分析装置	分析対象とした CPFAEs	RSD (%)	検出限界 (mg/kg)	注入量 (μl)	サンプル溶液濃度 (mg/ml)	固相抽出	参考文献番号	出典
1	LC-ToF MS	Mono and Di-Ester	-	< 1.69	5	20.0	-	41	J. Am. Oil Chem. Soc., <b>88</b> , 1-14 (2011)
2	LC-QqQ MS	Mono-Ester	15.5	< 0.08	10	10.0	+	42	Food Addit. Contam., <b>28</b> , 1492-1500 (2011)
		Di-Ester	13.5	< 0.07	10	10.0	+		
3	LC-ToF MS	Mono-Ester	30.6	< 0.05	2	16.0	+	43	J. Chromatogr. A, <b>1236</b> , 4748-4754 (2012)
		Di-Ester	17.1	< 0.02	2	16.0	+		
4	LC-QqQ MS	Mono-Ester	7.9	< 0.06	5	40.0	+	44	J. Agric. Food Chem., <b>61</b> , 4737-4747 (2013)
5	LC-QqQ MS	Di-Ester	10.7	< 0.01	5	40.0	+	45	J. Agric. Food Chem., <b>61</b> , 4748-4757 (2013)

図 6 既報の CPFAEs 分析法の比較

### 1-6. 超臨界流体クロマトグラフィー

超臨界流体とは、ある物質を臨界点以上の温度、圧力下においた状態のことをいう。この状態となった物質は気体様の拡散性と液体様の溶解性を併せ持つようになる。多くの物質の中でも、二酸化炭素は臨界温度 31.1°C、臨界圧力 7.38 MPa で容易に超臨界状態にすることができ (図 7)、無毒性、無反応性、取り扱いの簡便さのため、抽出・有機合成・材料合成などの分野で応用されている。

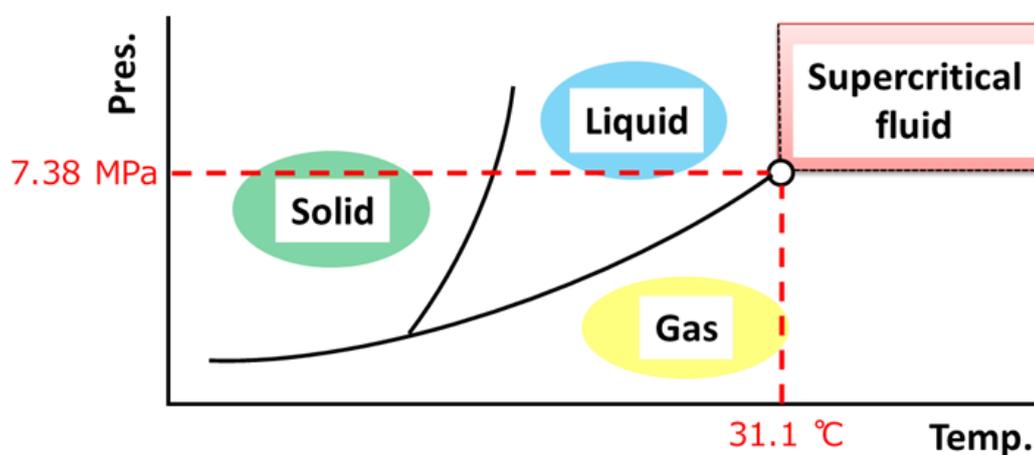


図 7 二酸化炭素の三態図

近年、脂質の分析において、移動相に超臨界二酸化炭素 (Supercritical carbon dioxide ; SCCO<sub>2</sub>) を用いている超臨界流体クロマトグラフィー (supercritical fluid chromatography: SFC) が適用されている。SCCO<sub>2</sub> は低粘性、高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好適な性質を有しており、高流速分析においても高い分離能を示すことから、SFC の移動相としてよく用いられる。さらに、SCCO<sub>2</sub> は極性がヘキサンに近い為、疎水性化合物をよく溶かすことから、低極性化合物の分析に適している (48-50)。さらに、移動相にメタノールなどの高極性の有機溶媒を用いることが可能である。つまり、1 分析上でヘキサンと同程度の極性を有する SCCO<sub>2</sub> から、メタノールまで移動相の極性を大幅に変化させることが可能である。加えて SCCO<sub>2</sub> は、液体に比べ拡散性が高く粘性が低い (表 4)。そのため、LC よりも短時間で高い分離能を得ることができ、カラムにかかる圧力も LC に比べ小さいことから、カラム長延長により分離能を向上させることが可能である。拡散性が高いことから、サンプルの希釈溶媒が速やかに移動相と混和する。そのため、クロマトグラフィーの性能がサンプルの希釈溶媒の組成に影響されることも少ない (図 8)。SFC を用いることにより、逆相 LC では困難であった低極性化合物の高速分離が可能である。これまでの研究では、大豆中の脂質のプロファイリング (図 9) や血中の酸化脂質の分析等、低極性化合物に関する分析系が考案されている (51-59)。さらに、広範な極性を有する農薬の網羅分析系 (60) や、乳化剤であるショ糖脂肪酸エステルの分離にも SFC が適用されている (61)。

表 4 気体，超臨界流体，液体の密度・拡散係数・粘度

物性	密度 [kg/m <sup>3</sup> ]	拡散係数 [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> /s]	粘度 [10 <sup>-5</sup> Pa/s]
気体	0.6–2	1000–4000	1–3
超臨界流体	300–900	20–700	1–9
液体	700–1600	0.2–2	200–300

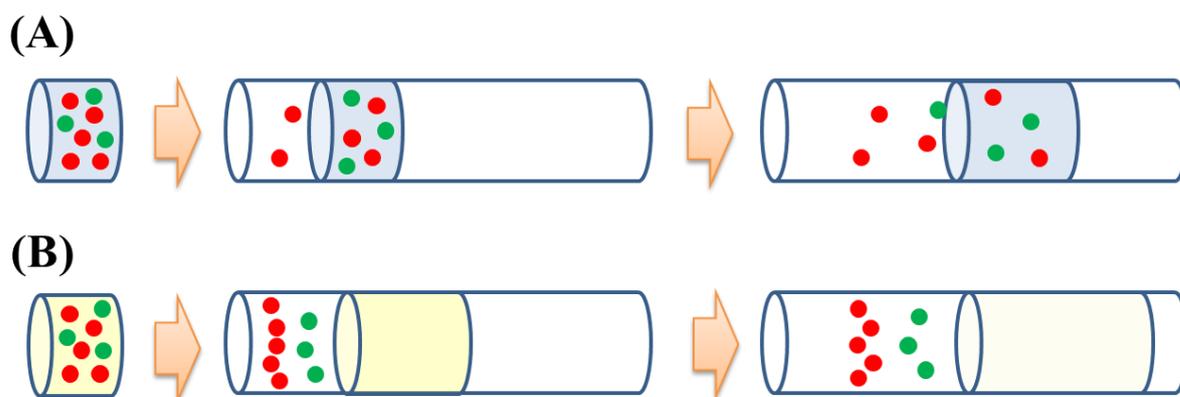


図 8 分離カラム中の化合物，希釈溶媒の分離挙動

(A) LC における CPFAEs の分離挙動，(B) SFC における CPFAEs の分離挙動の概要を示している．サンプルの希釈溶媒が移動相よりも溶出力が強く，かつ移動相と混和しにくいため，CPFAEs がカラムの導入部で濃縮されず，ピークがブロードになる．対して SFC の場合は，移動相に使用している SCCO<sub>2</sub> が低粘度，高拡散性を有するため，希釈溶媒が速やかに移動相と混和し，CPFAEs がカラムに保持される．

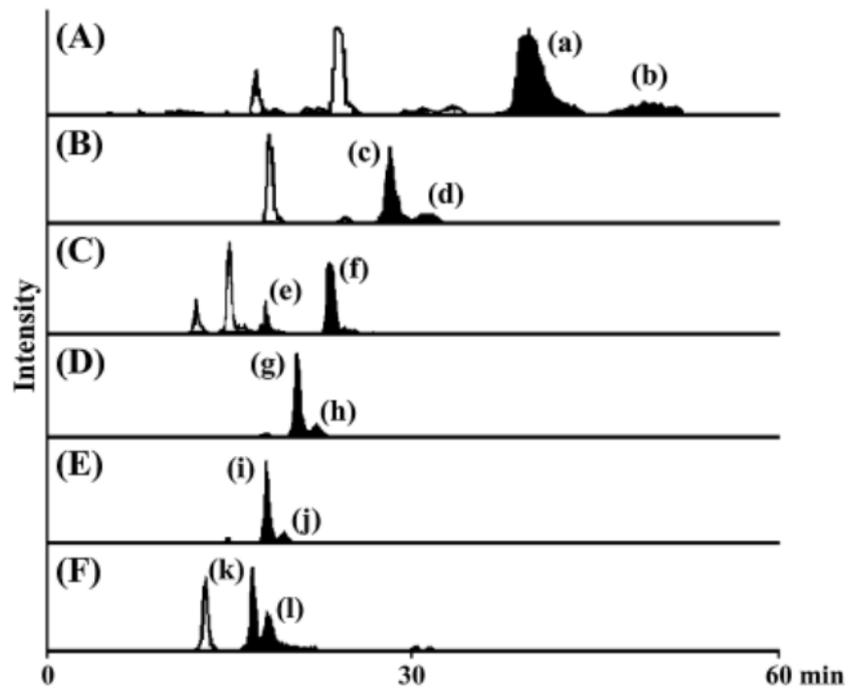


図 9 大豆油中の TAG 分析 (42)

クロマトグラフ上の小文字アルファベットはそれぞれ次の化合物を表す.

(a)SOS (b) SSO, (c) SOP, (d) SPO, (e) SLPn, (f) SPLn, (g) POP, (h) PPO, (i) PLP, (j) PPL, (k) PLnP, (l) PPLn.

## 1-7. 本研究の目的

以上を踏まえ、本研究ではパーム油脂中に存在する CPFAEs の精密分析法の構築を試みた。前述の通り、CPFAEs は結合している脂肪酸の数、及び種類によりその極性が大きく変化する。加えて、油脂の主要構成成分である TAG を同時に分析系に供する必要がある。以上のことから本分析系で用いる分離系は、低極性化合物の分離に優れ、さらに幅広い分離モードを選択することのできる SFC を用いることとした。第二章では、食用油脂中の CPFAEs 分析における超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析 (SFC/MS) の適用について検討した。本章では、定量結果の再現性悪化の原因となる固相抽出を用いることのない分析系の構築を目指した。さらに、これまでの研究において報告されてきた、逆相 LC を分離系に用いた CPFAEs 分析法との比較を行い、CPFAEs 分析における SFC の有用性について述べた。続いて第三章では、MAG, DAG, TAG に塩素化合物として  $\text{FeCl}_2$  を添加し  $250^\circ\text{C}$  で加熱後、生成した CPFAEs のプロファイリングを構築した精密分析系を用いて実施し、CPFAEs 生成に関する新たな知見の取得を試みることで、構築した分析系の有用性を示した。最後に第四章では、第二章、第三章で得られた結果を踏まえて、本研究の総括及び CPFAEs に関する研究における本研究の意義を述べた。

## 第二章 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた CPFAEs 精密分析系の開発

### 2-1. 緒言

第一章で述べたとおり, CPFAEs の分析はこれまで LC/MS が分析装置として利用されてきた. ところが, CPFAEs の内, 脂肪酸が 1 つ結合したモノエステルと脂肪酸が 2 つ結合したジエステルでは, その極性が大きく異なる. さらに, サンプルの希釈溶媒がクロマトグラフィーの性能に及ぼす影響が大きい. よって, サンプルの希釈溶媒の影響がなく, CP モノエステル, ジエステルの良好な分離を LC にて行うことは困難であった. そのため CPFAEs の分析系構築のためには, LC とは異なる分離手法が求められた.

脂質の分析において, 移動相に超臨界流体二酸化炭素を用いている超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) が適用されている. SFC を用いることにより, 逆相 HPLC では困難であった低極性化合物の高速分離が可能である. これまでの研究では, 大豆中の脂質のプロファイリングや血中の酸化脂質の分析等, 低極性化合物に関する分析系が考案されている (51-59). さらに, 広範な極性を有する農薬の網羅分析系にも SFC が用いられている (60). 以上の事から, 幅広い極性を有する CPFAEs に関しても, SFC を適用することにより高速・高分離分析が可能であると考えられる. 以上のことから本項では, SFC/MS を用いた CPFAEs 分析系の構築を試みた.

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 試薬

rac-1-palmitoyl-3-chloropropanediol (POHCl), rac-2-palmitoyl-3-chloropropanediol (OHPCI), rac-1-palmitoyl-2-chloropropanediol (PCIOH), rac-1-oleoyl-3-chloropropanediol (OOHCl), rac-2-oleoyl-3-chloropropanediol (OHOCI), rac-1-oleoyl-2-chloropropanediol (OCIOH), rac-1,2-di palmitoyl-3-chloropropanediol (PPCI), 1,3-di palmitoyl-2-chloropropanediol (PCIP), rac-1,2-di oleoyl-3-chloropropanediol (OOCl), 1,3-di oleoyl-2-chloropropanediol (OCIO), rac-1-palmitoyl-2-linoreoyl-3-chloropropanediol (PLCl), rac-1-palmitoyl-2-stearoyl-3-chloropropanediol (PSCl), rac-1-oleoyl-2-linoreoyl-3-chloropropanediol (OLCl), rac-1,2-di palmitoyl-3-chloropropanediol-d5 (PPCI-d5) は Toront research chemicals Inc. (ON, Canada) より入手した. rac-1-palmitoyl-2-oleoyl-3-chloropropanediol (POCl), rac-1-stearoyl-2-oleoyl-3-chloropropanediol (SOCl) は月島食品工業 (Tokyo, Japan) より入手した. メタノール, アセトニトリル, イソプロパノール, ヘキサン, 超純水, クロロホルム, ギ酸, ギ酸アンモニウムは和光純薬 (Osaka, Japan) より入手した.  $\text{FeCl}_2$  は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より入手した.

### 2-2-2. CPFAEs スクリーニングに用いた油脂サンプル

Crude Palm Oil は PALMAJU EDIBLE OIL Sdn. Bhd. (Johor, Malaysia) より分与頂いたものを使用した. この Crude Palm Oil の MAG, DAG, TAG の組成比はそれぞれ MAG <1%, DAG 6.9%, TAG 93.1% であった. この組成比は示差屈折検出計 (Refractive Index Detector) を検出計に備えた LC-RI を用いて分析を行った. YMC-Pack ODS-A (250 mm × 4.2 mm i.d., 5 μm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) を分離カラムに使用し, カラムオープン温度は 25°C に設定した. アイ

ソクラティックによる分離を行い、流速は 0.9 mL/min とした。LC-RI の移動相はアセトン/アセトニトリル = 8/2 (v/v) とした。

### 2-2-3. 油脂サンプルの加熱処理方法

100 mg/mL の濃度の FeCl<sub>2</sub> -メタノール溶液を調製した。本溶液を Phyrex アンプルに 10 µL 添加した後、メタノールを蒸発させた。続いて、この Phyrex アンプルに Crude palm oil を 10 mg 添加し、N<sub>2</sub> ガスでヘッドスペース部を置換した後、ガスバーナー (Style Index CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて封管した。封管した Phyrex アンプルはマッフル炉 (NITTO KAGAKU CO., LTD., Aichi, Japan) を用いて 250°C にて 90 分間加熱処理を行った。処理した油脂サンプルは 0.5 mL のクロロホルムを用いて溶解し、ヘキサンにて 2 倍希釈したものを試験用液とした。検液中の脂質濃度は 10 mg/mL となる。

### 2-2-4. CPFAEs スクリーニングに用いた LC/TOF MS の分析条件

LC には Ultimate 3000 (Dionex corporation, CA, USA) を用いた。分離カラムには、カラムサイズが 150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm の L-column ODS (Chemicals Evaluation Research Institute, Tokyo, Japan) を用いた。カラムオーブンの温度は 40°C とした。移動相 A にはメタノール/アセトニトリル/水 (19/19/2, v/v/v), 移動相 B にはイソプロパノールを用いた。それぞれの移動相には添加剤としてギ酸アンモニウムとギ酸を加えた。各添加剤の濃度はギ酸アンモニウム; 20 mM, ギ酸; 5 mM とした。流速は 0.5 mL/min に設定した。化合物の分離にはグラジエントを用いた。グラジエント条件は次の通り; 10% (0 - 3 min), 10–100% (3 - 19 min), 100% (19 - 39 min), 100–10% (39 - 40 min), 10% (40 - 45 min)。インジェクション量は 10 µL とした。

検出器として用いた質量分析計には、飛行時間型質量分析計 (Time of flight mass spectrometer; TOF MS) である MicrOTOF II (Bruker Daltonics Inc., MA, USA) を使用した。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization; ESI) を選択し、陽イオンモード (Positive ion mode) による分析を行った。質量分析計の各種分析パラメーターは次のように設定した。 Capillary voltage; 4.5 kV, dry temperature; 200°C, dry gas flow; 8.0 L/min. acquisition scan rate; 20 spectra/s, mass range; 50 to 1200. 取得した全てのデータは Data analysis (Bruker Daltonics Inc.) を用いて解析を行った。スクリーニングは表 5 に示した  $m/z$  にて実施した。

#### 2-2-5. CPFAEs の定量に用いた SFC/MS の分析条件

SFC には Analytical Method Station SFC system (Waters, MA, USA) を用いた。分離カラムにはカラムサイズが 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  の YMC Carotenoid (YMC Co., Ltd.) と、Inertsil ODS-4 (GL science, Tokyo, Japan) を使用した。

分離カラムに YMC Carotenoid を用いた場合の分析条件は次のように設定した。カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。また、背圧は 10 MPa とした。移動相には二酸化炭素 (99.99 %) を用い、加えてギ酸アンモニウムを 0.1 % 添加したメタノールをモディファイヤーとして用いた。流速は分析中に下記のように変化させた; 2 mL/min (0-7 min), 3 mL/min (7-22 min), 2 mL/min (22-25 min). モディファイヤーの濃度は次のように変化させた; 6% (0 - 1 min), 6-10% (1 - 5 min), 10% (5 - 7 min), 10-30% (7 - 11 min), 30% (11 - 22 min), 6% (22 - 25 min). インジェクション量は 5  $\mu\text{L}$  とした。

分離カラムに Inertsil ODS-4 を用いた場合の分析条件は次のように設定した。カラム温度は 35°C, 背圧は 10 MPa に設定した。移動相には高純度二酸化炭素

(99.99%) を使用し、移動相の流量は 3 mL/min に設定した。モディファイヤーとして、メタノール (添加材としてギ酸アンモニウムを 0.1% 添加したもの) とイソプロパノールを使用した。分析対象化合物の分離を行う際は、移動相中の 0.1% ギ酸アンモニウム含有メタノールの濃度を変化させることで実施した。モディファイヤーのグラジエントは次のように変化させた。5% (0 - 2 min), 5% -30% (2 - 7 min), 30% (7 - 8.2 min)。分析対象化合物が全て溶出した後、イソプロパノールをモディファイヤーとして添加することで、カラム内の洗浄を行った。移動相中のイソプロパノール濃度は 30% に設定し、洗浄は分析時間が 8.2 min から 14 min まで実施した。最後に、カラムのコンディショニングを 0.1% ギ酸アンモニウム含有メタノールを使用して実施した。移動相中の 0.1% ギ酸アンモニウム含有メタノール濃度は 5% に設定し、洗浄は分析時間が 14 min から 16 min まで実施した。

検出器には三連四重極型の質量分析計である Xevo TQ (Waters, MA, USA) を用いた。イオン化法には ESI を選択し、ポジティブイオンモードでの分析を行った。質量分析計の各種分析条件は次の通り; capillary voltage, 3.0 kV; cone voltage, 30 V; desolvation temperature, 600°C; desolvation gas flow, 800 L/h; cone gas flow, 60 L/h。得られた全データは Mass Lynx (Waters) を用いて解析を行った。

#### 2-2-6. 添加回収試験

Crude Palm Oil 1 kg あたり CPFAEs 標準品を 5 mg, 50 mg, 500 mg それぞれ添加し、分析に供した。

## 2-3. 結果・考察

### 2-3-1. LC/TOF MS を用いた分析対象化合物の選定

CPFAE の各脂肪酸エステル分子種を各々に定量出来る分析系を構築する場合、分析対象化合物が多岐にわたる点が問題となる。例えば、パーム油脂中の主要脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸を脂肪酸側鎖に持った CPFAEs は 46 種存在する。

そこで本研究では、まず分析対象化合物の選定を行った。2-2-3 にて示した手法にて Crude Palm Oil を処理し、生成した CPFAEs のスクリーニングを行った。スクリーニングには、精密質量分析が可能な TOF MS を検出計として選択した。また、分離にはこれまでに CPFAEs の分析実績のある逆相 LC を用いた。スクリーニングの対象化合物は、パーム油脂中の主要脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸を脂肪酸側鎖に持った CPFAEs とし、各化合物のプロトン付加体、アンモニウム付加体、ナトリウム付加体の 3 種のイオンの  $m/z$  にてスクリーニングを実施した。表 5 に、スクリーニングを実施した CPFAEs の分子量、各イオン付加体の  $m/z$  を記載している。

スクリーニングの結果、 $m/z$  が 604.46, 632.49, 630.48, 628.46, 658.51, 656.50, 654.48, 366.23, 392.25 の Extracted Ion Chromatogram にてピークが確認された。一方で、塩素原子が 2 つ結合した 1,3-DCP 及び 1,2-DCP 由来の  $m/z$  の Extracted Ion Chromatogram では、ピークが確認されなかった。以上の結果を踏まえて、表 6 に示した 15 種の化合物を分析対象化合物とし、標準品の準備を行った。

表5 CPFAEs スクリーニング時に設定した  $m/z$

グリセロール骨格に結合している 脂肪酸側鎖と塩素			分子量	$m/z$		
				H <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
C16:0 /	C16:0 /	Cl	586.46	587.46	604.46	609.46
C16:0 /	C18:0 /	Cl	614.49	615.49	632.49	637.49
C16:0 /	C18:1 /	Cl	612.48	613.48	630.48	635.48
C16:0 /	C18:2 /	Cl	610.46	611.46	628.46	633.46
C18:0 /	C18:0 /	Cl	642.52	643.52	660.52	665.52
C18:0 /	C18:1 /	Cl	640.51	641.51	658.51	663.51
C18:0 /	C18:2 /	Cl	638.49	639.49	656.49	661.49
C18:1 /	C18:1 /	Cl	638.50	639.50	656.50	661.50
C18:1 /	C18:2 /	Cl	636.48	637.48	654.48	659.48
C18:2 /	C18:2 /	Cl	634.46	635.46	652.46	657.46
C16:0 /	OH /	Cl	348.23	349.23	366.23	371.23
C18:0 /	OH /	Cl	376.26	377.26	394.26	399.26
C18:1 /	OH /	Cl	374.25	375.25	392.25	397.25
C18:2 /	OH /	Cl	372.23	373.23	390.23	395.23
C16:0 /	Cl /	Cl	366.20	367.20	384.20	389.20
C18:0 /	Cl /	Cl	394.23	395.23	412.23	417.23
C18:1 /	Cl /	Cl	392.22	393.22	410.22	415.22
C18:2 /	Cl /	Cl	390.20	391.20	408.20	413.20

表 6 スクリーニングの結果分析対象化合物として選択した CPFAEs と

MRM 条件, バリデーション結果

<i>sn</i> -1 or <i>sn</i> -3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 or <i>sn</i> -3	Symbol	Q1 ion (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ( <i>m/z</i> )	Q3 ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	Retention time (min)	LOD (nmol/g)	LOQ (nmol/g)
C16:0	OH	Cl	POHCl	366.1	239.2	10	12	7.78 ± 0.03	1.03	3.52
				366.1	349.1	10	8			
OH	C16:0	Cl	OHPCl	366.1	239.2	12	8	7.96 ± 0.02	-	-
				366.1	349.1	10	12			
C16:0	Cl	OH	PClOH	366.1	239.2	12	12	8.09 ± 0.02	0.75	2.48
				366.1	349.1	12	8			
C18:1	OH	Cl	OOHCl	392.1	265.1	14	8	7.91 ± 0.03	0.79	2.65
				392.1	375.1	10	12			
OH	C18:1	Cl	OHOCl	392.1	265.1	12	8	8.16 ± 0.03	-	-
				392.1	375.1	10	12			
C18:1	Cl	OH	OClOH	392.1	265.1	10	10	8.16 ± 0.03	0.38	1.32
				392.1	375.1	14	14			
C16:0	C16:0	Cl	PPCl	604.4	331.1	22	20	14.03 ± 0.04	0.28	0.96
C16:0	Cl	C16:0	PClP	604.4	331.1	24	18	14.03 ± 0.04	-	-
C18:1	C18:1	Cl	OOCl	656.4	357.1	24	20	13.97 ± 0.04	0.25	0.87
C18:1	Cl	C18:1	OClO	656.4	357.1	22	18	14.21 ± 0.05	0.08	0.25
C16:0	C18:2	Cl	PLCl	628.5	331.4	10	12	13.20 ± 0.07	0.19	0.65
				628.5	355.3	10	8			
C18:1	C18:2	Cl	OLCl	654.5	355.2	12	8	13.36 ± 0.07	0.24	0.83
				654.5	357.2	10	12			
C16:0	C18:1	Cl	POCl	630.5	331.2	12	12	13.78 ± 0.08	0.20	0.66
				630.5	357.2	12	8			
C18:0	C18:1	Cl	SOCl	658.5	357.2	14	8	15.50 ± 0.11	0.22	0.71
				658.5	359.5	10	12			
C16:0	C18:0	Cl	PSCl	632.5	331.2	12	8	16.37 ± 0.14	0.22	0.75
				632.5	359.3	10	12			

LOD ; 検出限界 (Limit of detection)

### 2-3-2. 三連四重極型質量分析計の分析条件検討

各分析対象化合物の標準品を使用してインフュージョン分析を実施し、三連四重極型質量分析計 (QqQ MS) の分析条件の検討を実施した。

インフュージョン分析を行う際は、各標準品を 100 ng/mL の濃度に希釈し実施した。希釈溶媒には 0.1% ギ酸アンモニウム含有メタノールを使用した。これは、各化合物をアンモニウム付加体として検出する為である。過去の報告では、CPFAEs はナトリウム付加体として検出されやすいとされている (41, 47)。そのため、検出感度向上の為、移動相に酢酸ナトリウムやギ酸ナトリウムを添加して分析を行っている報告もある。しかし酢酸ナトリウムやギ酸ナトリウムといった、ナトリウム付加体を検出しやすくするための添加剤は不揮発性の塩である。その為、質量分析計のインターフェースが汚染され、検出感度に悪影響を及ぼす。一方で、アンモニウム付加体の生成を促すために移動相に添加するギ酸アンモニウムは、揮発性の塩である。揮発性の塩を添加剤に使用することで、不揮発性の塩を使用した場合のような問題を排除することができる。以上のことから本研究では、添加剤には揮発性の塩であるギ酸アンモニウムを使用し、分析対象化合物とした CPFAEs は全てアンモニウム付加体として検出することとした。ポジティブイオンモードによるインフュージョン分析の結果、各 CPFAEs のアンモニウム付加体を検出することができた (表 6)。本実験にて得られたアンモニウム付加体を、後述の分析条件検討の際のプリカーサーイオンとして選択した。

続いて、各標準品を用いて質量分析計の分析条件の検討を行った。これまでの報告から、食用油脂中に含まれる各 CPFAEs の濃度は 1 mg/kg 程度と推察された (47)。よって、CPFAEs 分析系構築においては、少なくとも 1 mg/kg 程度の CPFAEs を定量出来る検出計が求められた。そこで本研究では、高感度・高

選択性が特徴の Multiple Reaction Monitoring (MRM) による分析系の構築を試みた。各 CPFAEs の標準品を個々にインフュージョン分析に供し Collision Indusion Detection (CID) を行った。前述の試験にて取得したプリカーサーイオンから得られるプロダクトイオンスペクトルの確認後、最も強度の高いプロダクトイオンを Q3 イオンとして選択した。各 CPFAEs は、結合している脂肪酸が解離したものがプロダクトイオンとして検出された。

続いて、プリカーサーイオンと、Q3 イオンとして選択したプロダクトイオンの強度が最も強くなるように、コーン電圧とコリジョンエネルギーの最適化を行った。コーン電圧は 10 V から 40 V まで 2 V 刻みで測定を行い、プリカーサーイオンの強度の確認を行った。コリジョンエネルギーは、9 V から 23 V まで 2 V 刻みで測定を行い、プロダクトイオンの強度の確認を行った。設定した各 3-MCPD 脂肪酸エステル の MRM トランジション、最適化されたコーン電圧及びコリジョンエネルギーを表 6 に示す。

### 2-3-3. SFC を用いた CPFAEs の分離条件検討

検出計の分析条件検討に続いて、SFC による CPFAEs の分離条件の検討を実施した。まずは分離に用いるカラムの選定を行った。CPFAEs の分離には逆相モードを用いることを選択した。逆相モードを用いることで、MAG, DAG, TAG 等の脂質の脂肪酸分子種の違いによる分離が行える。CPFAEs の場合も、逆相モードを用いることにより各分子種を分離することが出来ると考えられた。分離に使用した逆相系のカラムは、残存シラノール基をエンドキャップ処理したオクタデシルシリル (ODS) シリカカラム (Inertsil ODS-4) を選択した。またモディファイヤーにはメタノールを選択した。SFC を用いた分析系では、移動相に用いている超臨界流体にメタノールやイソプロパノールといった有機溶媒を任意

の割合で添加することにより、各化合物の保持力を変化させることができる。本研究においても、移動相における Modifier の割合を変化させることにより、分子種により極性が大きく異なる CPFAEs を良好に分離できると考えた。Modifier にはメタノールを使用した。これは、SFC を用いて多種の農薬の分離を試みた研究において、分離にメタノールを Modifier として使用していた為である。農薬は、その化学構造の違いから種類によって極性が大きく異なる。前述の研究において、そのような極性が大きく異なる農薬を、メタノールを Modifier に使用し良好に分離していたことから、本研究においてもメタノールを Modifier として使用することが好適であると考えた。

ODS カラムを分離カラムに使用し、メタノールを Modifier とした場合、CPFAEs の各分子種を 9 分以内に溶出させることが出来た。さらに、固相抽出を用いず分析を実施している為、スキャンモードにて同時に分析を行うことで CPFAEs の他に DAG や TAG を同時に検出することが出来た (図 10)。ところが、POCI, OOCI のクロマトグラムにおいて問題が生じた。図 11 に、POCI と PLCI の標準品混合溶液を分析した際に得られた MRM クロマトグラムを示しているが、POCI (630.1 > 357.2) のピークの前に POCI とは異なるピークが確認できる。このピークは PLCI アンモニウムイオン付加体の同位体由来のピークである。POCI のアンモニウムイオン付加体は  $m/z = 630$  を有する。一方、PLCI のアンモニウムイオン付加体は  $m/z = 628$  を有するイオンであり、 $m/z = 629, 630$  の同位体イオンを有する。この  $m/z = 628$  の同位体イオンを POCI の MRM トランジションにて検出した結果、図 11 の POCI (630.1 > 357.2) にあるようなピークとなったと考えられる。CPFAEs を分析する場合、分子構造にハロゲンを含んでいる為 2 番目の同位体イオンの強度が高くなる

ことから (図 12), 同位体イオンの影響を無視することができない. そこで, SFC 上での各化合物のベースライン分離を試みた.

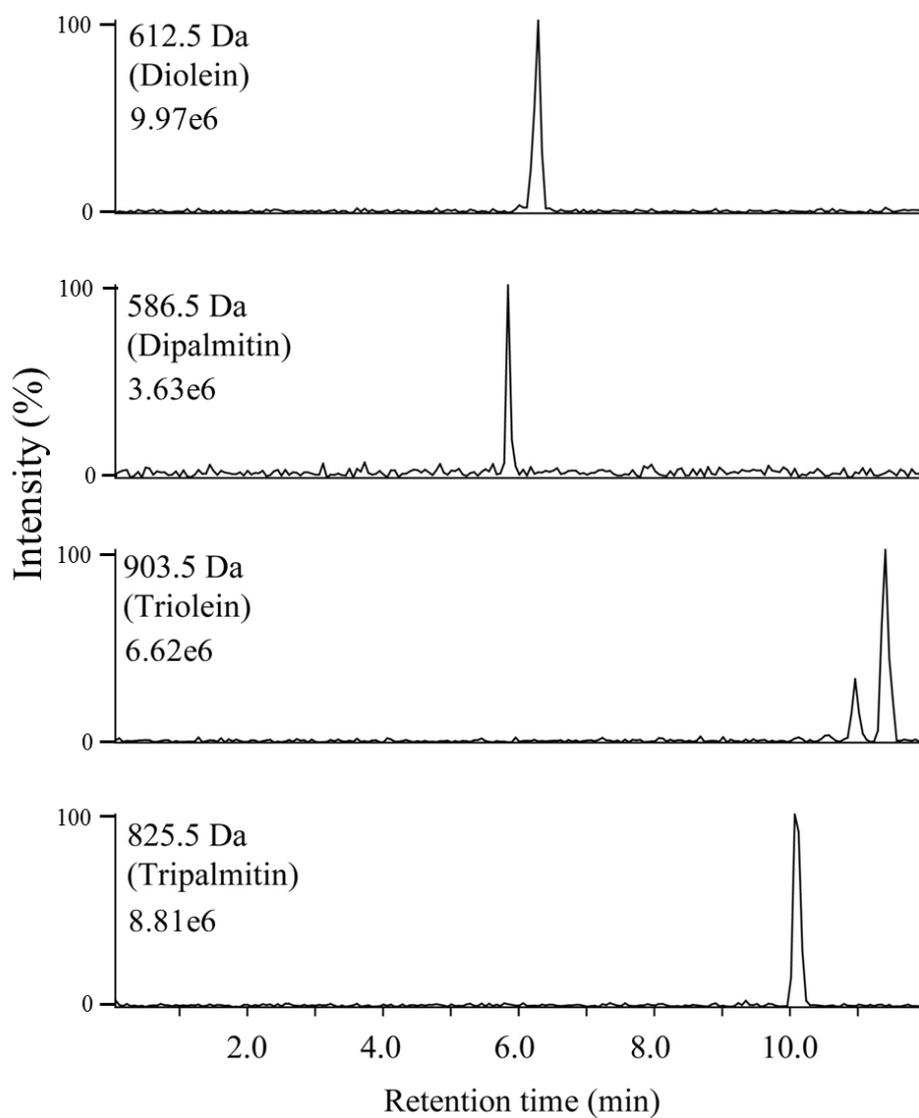


図 10 DAG, TAG のクロマトグラム

パルミチン酸, オレイン酸を脂肪酸側鎖に有した DAG, TAG のクロマトグラムを示している.

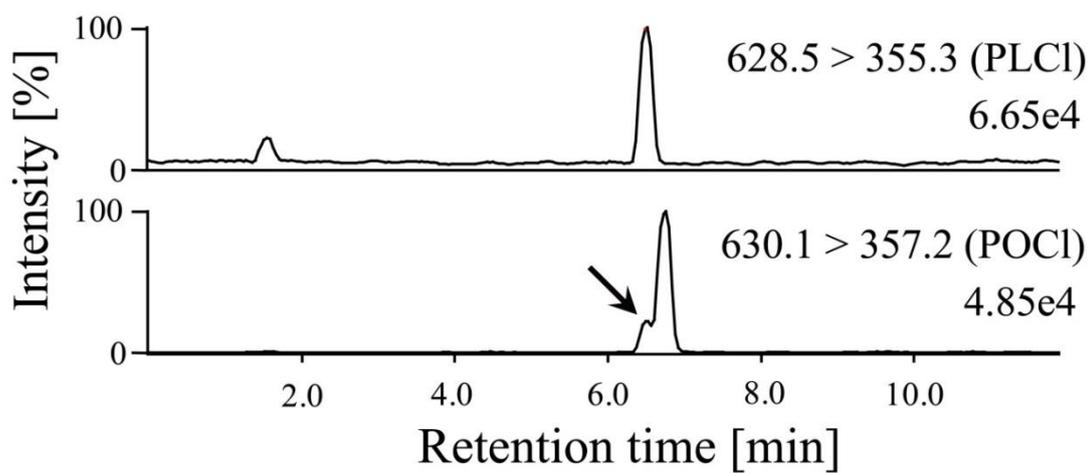


図 11 PLCl, POCl の MRM クロマトグラム

クロマトグラム上の矢印で示したピークが、PLCl アンモニウムイオン付加体の同位体イオン由来のピークである。

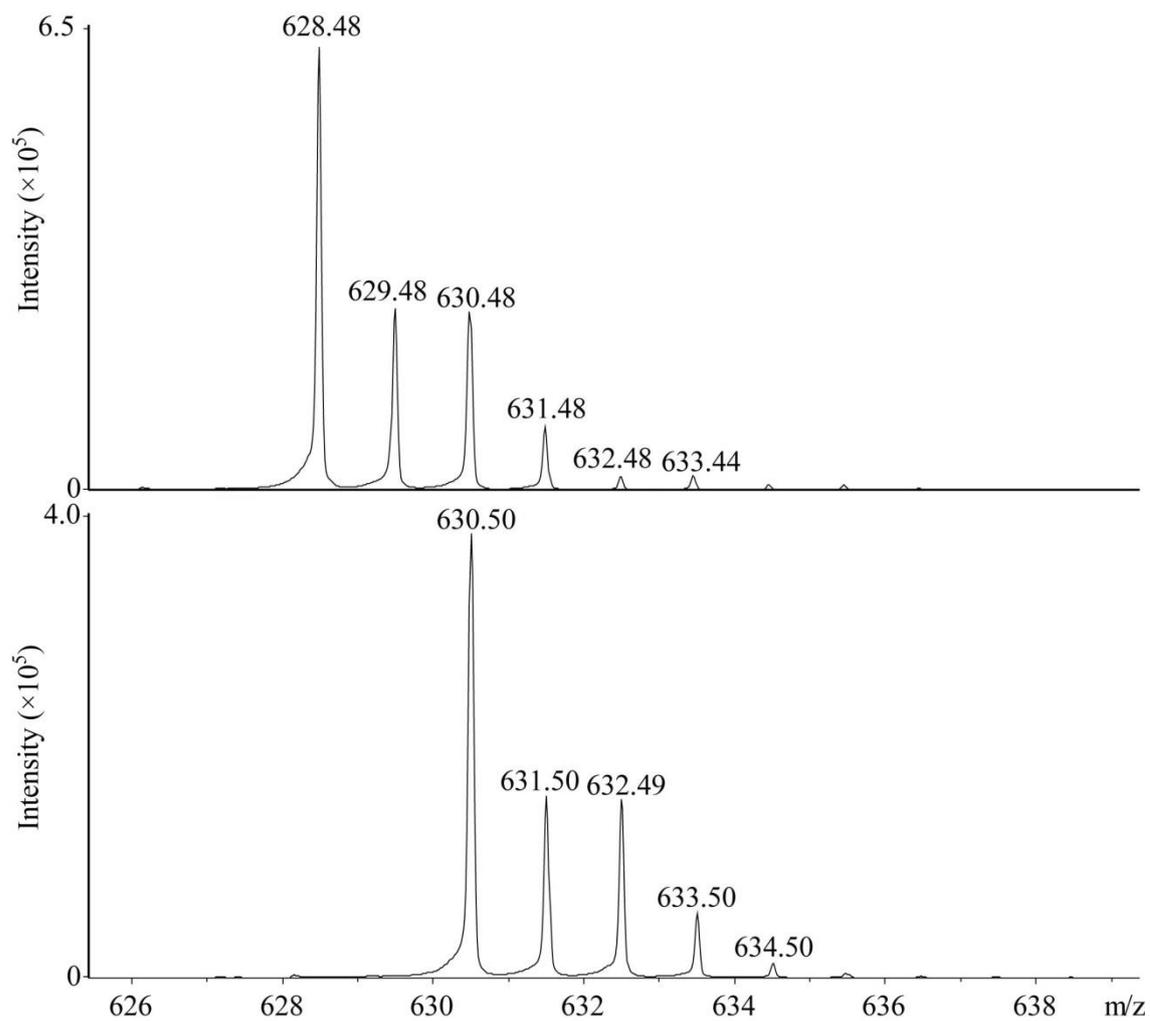


図 12 POCl アンモニウムイオン付加体 ( $m/z = 630.50$ ) と PLCl アンモニウムイオン付加体 ( $m/z = 628.48$ ) のマススペクトル

前述の試験を踏まえ、シリカに C30 の炭素鎖を化学結合基に有する YMC Carotenoid を二本直列に連結させ CPFAEs の分離を試みた。C30 カラムは、ODS カラムよりも化学結合基の鎖長が長い。C30 カラムを用いることで、疎水性の高い CP ジエステルを強く保持させ、かつ二本直列につなぎ理論段を高くすることにより、各化合物のベースライン分離が可能と考えた。さらに本カラムはカラム固定相の残存シラノール基のエンドキャップ処理を施していない。そのため、分子構造内に OH 基を有する CP モノエステルをエンドキャップ処理を施しているカラムと比較して強く保持できると考えた。C30 カラムを用いて分離を行った結果を図 13 に示している。各 CPFAEs がベースライン分離できており、かつ他の化合物の同位体イオン由来のピークと供溶出することのない分離系が構築できた。

今回の分析系では、サンプルの希釈溶媒にヘキサンを用いている。既存の CPFAEs 分析系を用いて本サンプルを分析した場合、化合物の保持やピークの形状に影響を与える。ところが、SFC を分離系に据えた本分析系では、ピークの形状に影響なく、分離を行うことが出来ている。

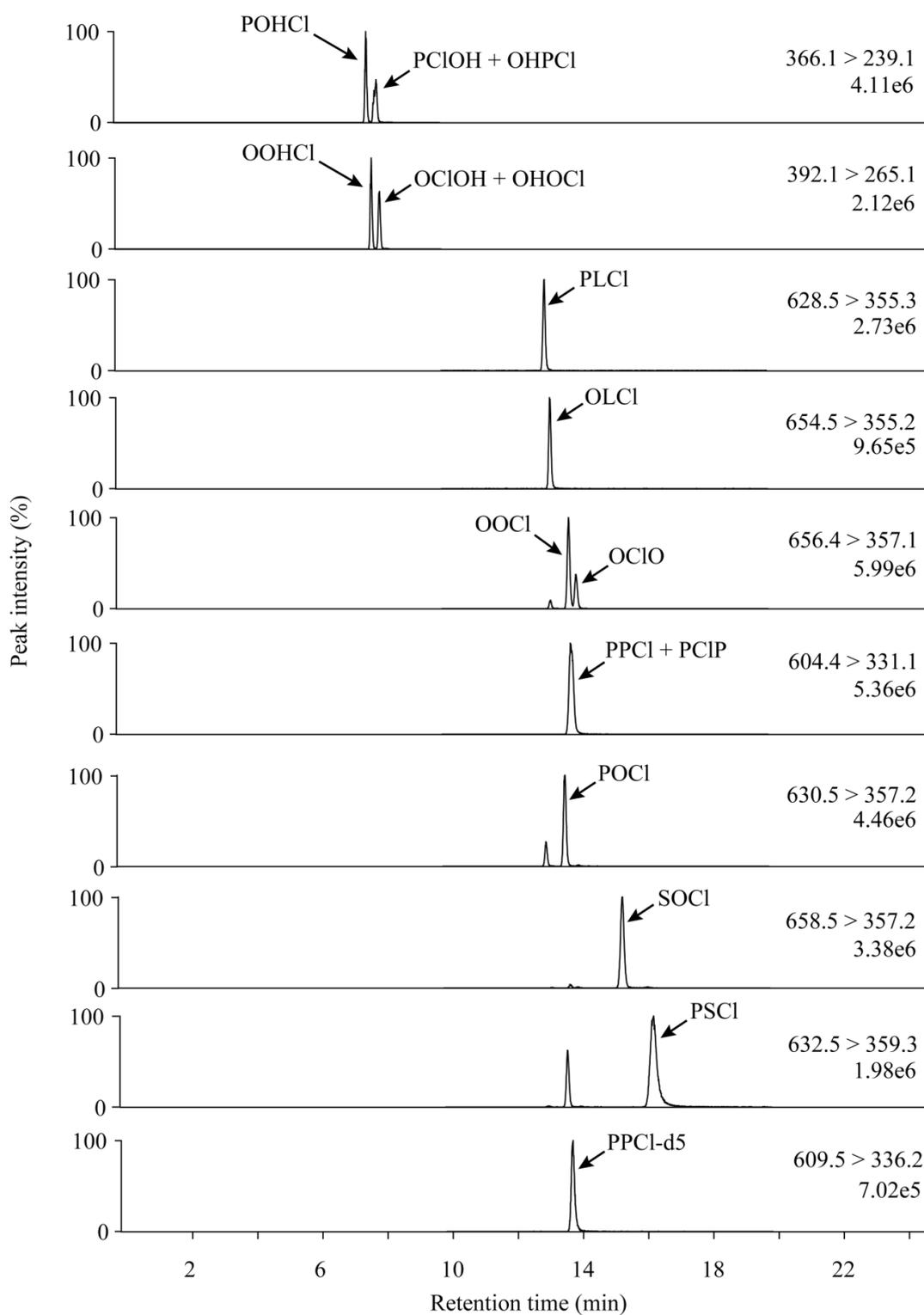


図 13 各標準品の混合溶液を新たに構築した分析系にて分析して  
得られた MRM クロマトグラム (100 ng/mL)

さらに本検討では、脂肪酸分子種ごとの分離と同時に塩素の結合位置による分離も試みた。塩素の結合位置の違いによる分離は、 $\text{POHCl}$ ,  $\text{OHPCl}$ ,  $\text{PClOH}$ ,  $\text{OOHCl}$ ,  $\text{OHOCi}$ ,  $\text{OCiOH}$ ,  $\text{PCiP}$ ,  $\text{PPCl}$ ,  $\text{OOCi}$ ,  $\text{OCiO}$  の化合物を用いて検討した。図 14 に  $\text{OOHCl}$ ,  $\text{OHOCi}$ ,  $\text{OCiOH}$  の分離を示したクロマトグラムを、図 15 に  $\text{OCO}$ ,  $\text{OOCi}$  の分離を示したクロマトグラムをそれぞれ示している。

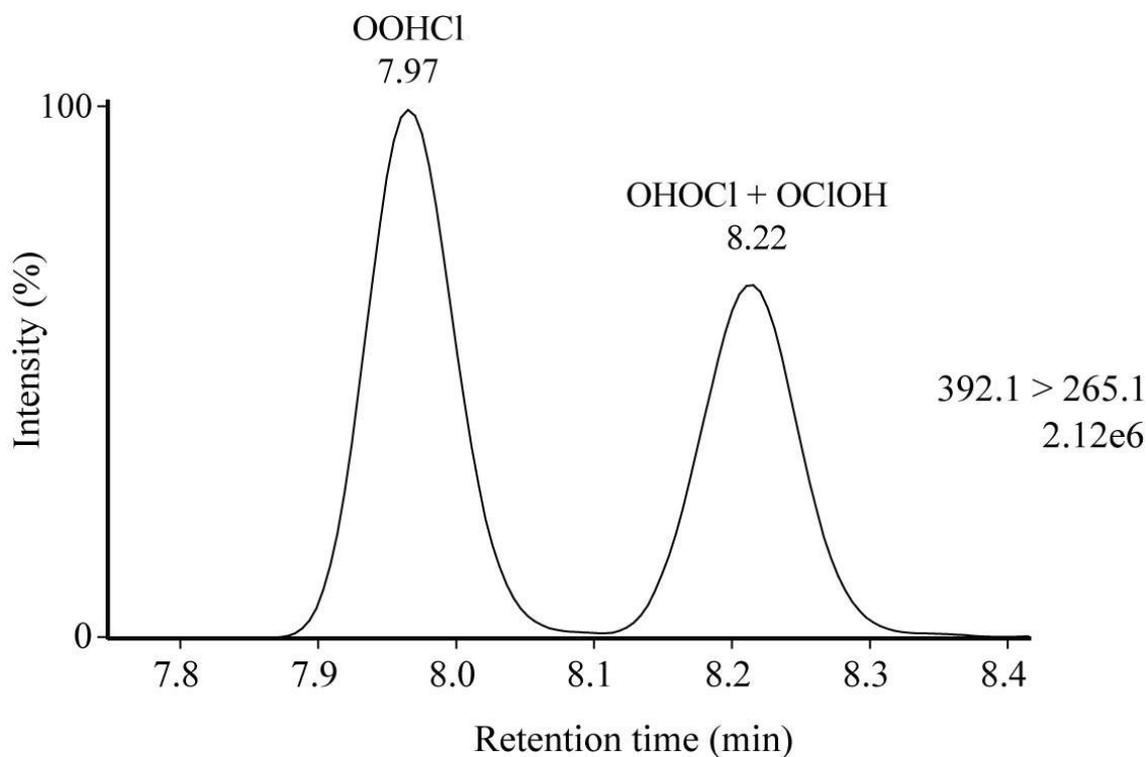


図 14  $\text{OOHCl}$ ,  $\text{OHOCi}$ ,  $\text{OCiOH}$  の MRM クロマトグラム

クロマトグラム上の数値は、各ピークのリテンションタイム (min) を示している。

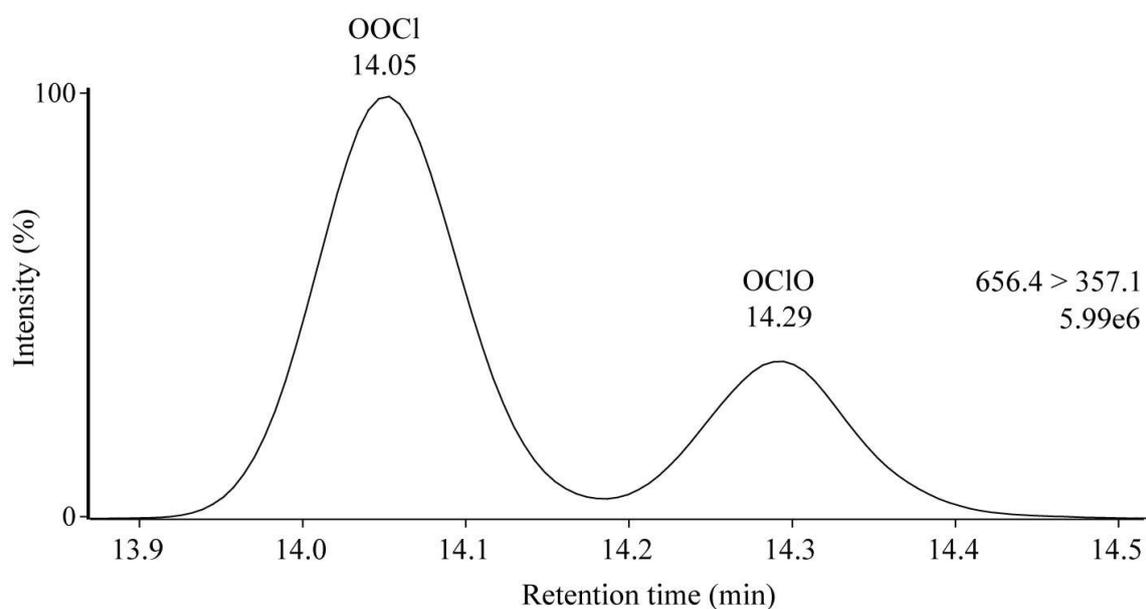


図 15 OCIO, OOCI の MRM クロマトグラム

クロマトグラム上の数値は、各ピークのリテンションタイムを示している。

OOHCl と OHOCI, OCIOH の分離に関して、二位に OH 基が結合した OOHCl と三位に結合した OHOCI と OCIOH の分離は出来たが、OH 基が同じ三位に結合した OHOCI と OCIOH の分離出来なかった。本分析系においては、OH の結合位置が化合物のカラムへの保持に影響を与えていると考えられる。本研究で使用した C30 カラムは、エンドキャップを施していない。そのためシリカ表面の残存シラノール基と分析対象化合物中の OH 基が水素結合を形成する。OH 基が化合物の構造の外側に配置される OHOCI と OCIOH は、シリカ表面の残存シラノール基とより強く相互作用を形成し、その結果、今回のような分離挙動を示したと考えられる。POHCl と OHPCI, PCIOH についても、同様の現象が生じた結果、図 13 に示した分離挙動となったと考えられる。

PPCI と PCIP は分離出来なかった一方で、OOCl と OCIO については、ベースライン分離を行うことが出来た。これら化合物の分離挙動の違いも、選択したカラムの特性が影響している。C30 カラムは、カロテノイドの幾何異性体を分離するために設計されたカラムであり、分子構造内の二重結合を認識する。分子構造内に二重結合を有する OOC1 と OCIO の場合は、カラム担体と疎水性相互作用に加え、上記の相互作用が働く。そのため、カラム担体が認識しやすい、三位に不飽和脂肪酸を側鎖として有する OCIO と、カラム担体が認識しやすい一位と、カラム担体が認識しにくい二位に不飽和脂肪酸を有する OOC1 が分離できたと考えられる。一方で、側鎖にパルミチン酸を有する PPCI と PCIP の場合は、分子構造内に二重結合を持たない。そのため、カラム担体と分子構造内二重結合との相互作用がなく、カラム担体との疎水性相互作用のみでの分離であったことから、PPCI と PCIP の分離が十分行われなかったと考えられる。以上のことから、側鎖に二重結合を持たない PPCI と PCIP の分離は出来なかったが、側鎖に二重結合を持つ OOC1 と OCIO の分離は行うことが出来たと考えられる。

上記のようなカラムの分離特性が顕著に得られた背景として、分離に SFC を適用したことが挙げられる。緒論において言及したとおり、SFC の移動相に使用している SCCO<sub>2</sub> は、LC の移動相に使用している液体溶媒と比較して拡散性が高い。そのため、カラムの化学結合基が速やかに立ち上がり、分析対象化合物が化学結合基の根元に存在している残存シラノールと直ちに相互作用できるようになると考えられた。さらに、LC と比較して移動相に使用する極性溶媒量が少ない。そのため、カラムに残存しているシラノール基と CPFAEs が有する OH 基の相互作用が LC の場合と比較して強くなる。このように、SCCO<sub>2</sub> を移動相に使用する SFC は、LC と比較して使用するカラムの特性が分離挙動に

強く現れるという性質を有している。本研究にて選択した C30 カラムは疎水性化合物を強く保持する、化合物の立体構造の違いを認識する、残存シラノールとの相互作用による OH 基認識能といった特性を有している。これら特性を利用することにより、分析対象化合物として選択した 15 種の CPFAE 分子種を良好に分離できたと考えられる。

これまで述べてきたように、本分析系では一部の化合物で位置異性体の分離を行うことが出来た。位置異性体を分離出来る本分析系を用いることで、CPFAEs の生成経路に関する研究遂行の一助になると考えられる。例えば、TAG から  $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  が生成する場合を考える。TAG からの  $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  生成は、TAG 各分子種から直接  $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  が生成し、さらに生成した  $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  が異性化するという経路が考えられる。TAG から直接  $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  が生成する場合、 $R_1R_1Cl$  の前駆体は  $R_1R_1R_1$  と  $R_1R_1R_2$  の 2 種となる (図 16 中の反応経路 1 に相当)。一方、 $R_1ClR_1$  の前駆体は  $R_1R_1R_1$  と  $R_1R_2R_1$  の 2 種となる (図 16 中の反応経路 2 に相当)。この場合、 $R_1R_1X$  は  $R_1ClR_1$  の前駆体にはならず、 $R_1R_2R_1$  は  $R_1R_1Cl$  の前駆体にはならない。ただし、 $R_1R_1Cl$  及び  $R_1ClR_1$  が生成した後異性化が生じた場合 (図 16 中の反応経路 3 に相当)、 $R_1R_1Cl$ ,  $R_1ClR_1$  の前駆体は  $R_1R_1R_1$ ,  $R_1R_1R_2$ ,  $R_1R_2R_1$  となる。 $R_1R_1Cl$  と  $R_1ClR_1$  を分離・分析することのできる本分析系を用いれば、TAG から CPFAEs が生成するところで反応が止まるのか、異性化まで進行するのか判断することが出来ると考えられる。

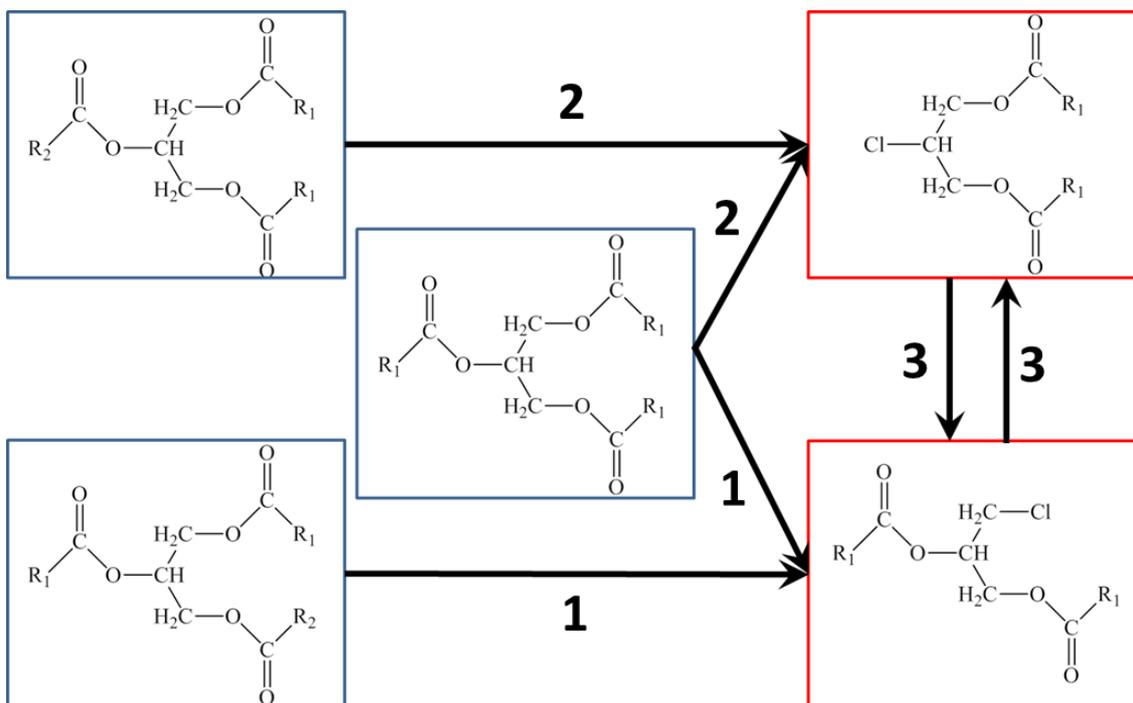


図 16 脂質から CPFAEs への予想生成経路

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>:脂肪酸側鎖

1: TAG から 3-MCPD 脂肪酸エステルへの反応経路

2: TAG から 2-MCPD 脂肪酸エステルへの反応経路

3: 異性化経路

#### 2-3-4. 構築した分析系の性能検証

最適化した各分析条件を用いて、各 CPFAEs の標準品を分析することで、各化合物の溶出時間の確認と再現性の確認を行った。さらに、検出限界と定量限界の確認も合わせて実施した。分析により得られた各バリデーションの結果を表 6 に示す。まず溶出時間であるが、各化合物とも分離できていることが見て取れる。さらに、10 回分析した際の溶出時間の相対標準偏差が 0.7 % 以下であり、再現性も良好であった。

本分析系における検出限界であるが、0.08 – 0.19 mg/kg であった。検出限界は S/N = 3 となる点としている。この検出感度は既存の分析系と同程度である。

添加回収試験は Crude Palm Oil に各標準品を一定量添加することで実施した。

添加した濃度は 5 mg/kg, 50 mg/kg, 500 mg/kg の 3 濃度とした。検討の結果得られた回収率は 69% - 109% であった (表 7)。

表 7 添加回収試験結果

	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
POHCl	69.50 ± 8.18	68.01 ± 14.32	72.79 ± 9.05
PClOH + OHPCl	70.33 ± 3.22	73.46 ± 14.98	76.83 ± 9.66
PPCl + PCIP	106.57 ± 2.38	98.58 ± 9.47	102.94 ± 19.54
OOHCl	85.87 ± 9.75	78.63 ± 15.56	88.11 ± 4.04
OHOC1 + OC1OH	87.04 ± 18.83	76.12 ± 17.37	88.78 ± 11.88
OOC1	101.67 ± 6.09	98.35 ± 3.36	109.34 ± 12.70
OC1O	96.00 ± 5.92	98.44 ± 8.96	105.87 ± 12.01
PLCl	90.96 ± 9.05	94.75 ± 3.53	73.27 ± 3.40
OLCl	99.91 ± 9.91	102.67 ± 8.01	109.43 ± 26.15
POCl	105.39 ± 2.63	102.44 ± 4.08	109.28 ± 20.40
SOCl	97.99 ± 5.34	97.43 ± 2.51	101.95 ± 4.19
PSCl	99.70 ± 7.01	96.89 ± 6.32	87.98 ± 2.32

(%)

## 2-4. 小括

これまでの CPFAEs 分析系では、分離系には逆相 LC を適用していた。加えて、サンプルの精製に固相抽出を用いていた。これは、油脂中に夾雑物として含まれる TAG 等の低極性化合物を除去する為である。固相抽出を用いない場合、夾雑物の影響により分析系が汚染される。さらに、サンプルの希釈溶媒には移動相の初期溶媒組成よりも溶出力の強い溶媒を使用する必要があった。その結果、化合物の保持に影響が生じ、ピークの形状の悪化が生じていた。そこで本章では、固相抽出の有無やサンプルの希釈溶媒に影響されず、連続分析が可能な分析系を構築すべく検討を実施した。分離系として低極性化合物の分離・分析に有用な SFC の適用を試みたところ、既存の分析系と同程度の検出感度を有し、かつ固相抽出の有無やサンプルの希釈溶媒に影響されない分析系が構築できた。加えて、既存の分析系では CP モノエステル、CP ジエステルそれぞれ個別の抽出法を設定しないと分析不可であるのに対し、本分析系は固相抽出を要することなく分析が可能である。よって、これまで報告されてきた逆相 LC を用いた分析系と比較して定量結果の再現性が良い (図 17)。固相抽出を用いない本分析系は、CPFAEs の精密分析を行う上で有用であると言える。

これまで構築されてきた LC/ESI MS を用いた分析系では、固相抽出によりサンプル中の夾雑物の除去を行った後、分析を実施するのが一般的である。これは Haines ら (41) の検討を踏まえ、CPFAEs 以外の化合物、特に低極性化合物である TAG を除去することが、LC/ESI MS を用い安定的に CPFAEs の定量を行う上で重要とされてきたためである。ところが、TAG をはじめとした中性脂質を夾雑物として除去した場合、これらの情報が失われるという欠点がある。前述の通り、CPFAEs は中性脂質と塩素が共存した状態で、これら化合物を高温で処理することにより生成するとされている。CPFAEs の生成メカニズムを

明らかにするうえで、生成した CPFAEs の分子種及びその生成量だけでなく、反応前後の TAG をはじめとした中性脂質の挙動も把握することは極めて重要である。固相抽出によるサンプルの精製を行うことなく分析を実施できる本分析系は、CPFAEs だけでなくその前駆体である MAG, DAG, TAG の評価も同時に行うことができる可能性を秘めたものである。

以上、本章における検討の結果から、CPFAEs 分析系に SFC を分離系として適用できることが確認された。加えて、既存の分析系に使用されている逆相 LC ではできなかった、CPFAEs とその前駆体である MAG, DAG, TAG の同時分析を行うことができる可能性も示すことができた。

	分析装置	分析対象とした CPFAEs	RSD (%)	検出限界 (mg/kg)	注入量 (μl)	サンプル溶液濃度 (mg/ml)	固相抽出	参考文献番号	出典
1	LC-ToF MS	Mono and Di-Ester	-	< 1.69	5	20.0	-	41	J. Am. Oil Chem. Soc., <b>88</b> , 1-14 (2011)
2	LC-QqQ MS	Mono-Ester	15.5	< 0.08	10	10.0	+	42	Food Addit. Contam., <b>28</b> , 1492-1500 (2011)
		Di-Ester	13.5	< 0.07	10	10.0	+		
3	LC-ToF MS	Mono-Ester	30.6	< 0.05	2	16.0	+	43	J. Chromatogra. A, <b>1236</b> , 4748-4754 (2012)
		Di-Ester	17.1	< 0.02	2	16.0	+		
4	LC-QqQ MS	Mono-Ester	7.9	< 0.06	5	40.0	+	44	J. Agric. Food Chem., <b>61</b> , 4737-4747 (2013)
5	LC-QqQ MS	Di-Ester	10.7	< 0.01	5	40.0	+	45	J. Agric. Food Chem., <b>61</b> , 4748-4757 (2013)
6	SFC-QqQ MS	Mono and Di-Ester	8.2	< 0.19	5	1.0	-		本研究

図 17 過去に報告された分析法との比較

### 第三章. 油脂中の CPFAEs 分析による構築した分析系の有用性の検証

#### 3-1. 緒言

第二章にて、SFC/MS を用いた CPFAEs 分析系の構築を行うことが出来た。そこで第三章では、構築した分析系の有用性を示すために、構築した分析系を用いて CPFAEs 生成に関する新たな知見の取得を試みた。これまでも CPFAEs の生成に関する研究が試みられてきた。ただし、これまでの研究はいくつかの問題点を抱えたものであった。一つは、CP の総量、もしくは一部の CPFAEs の増減のみを評価し考察を行っている点、そしてもう一つは、多様な化合物が様々な濃度で混在している複雑な系である食用油脂をサンプルに用いている点である。そこで本研究では、より単純な試験系で検討を行うことで、CPFAEs の生成に関する知見を得ようと試みた。つまり、本研究では各脂質と塩素化合物を高温で処理することで生成する CPFAEs のプロファイリングを行うこととした。CPFAEs は、パーム油脂の製造工程における脱臭操作時に生成することが、過去の研究にて明らかになっている (19)。よって本研究ではまず、脱臭操作時の環境を再現した *in vitro* でのサンプル調製法の構築を試みた。続いて、構築したサンプル調製法を用いて、単一の脂質と塩素源を反応させた場合に生成する CPFAEs のプロファイリングを行った。試験に用いた脂質として、MAG としてモノパルミチン、モノオレイン、DAG としてジパルミチン、ジオレイン、TAG としてトリパルミチン、トリオレイン の 6 種の脂質標準品を用いた。最後に、Crude Palm Oil をサンプル調製法にて処理し、生成した CPFAEs のプロファイリングを行った。本研究では、塩素化合物は過去の研究で Destillats らが用いた FeCl<sub>2</sub> を用いた (27)。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 試薬

トリオレイン, トリパルミチンは和光純薬より入手した. モノオレイン, ジオレイン, モノパルミチン, ジパルミチンは Sigma-Aldrich Corporation (MD, USA) より入手した.  $\text{FeCl}_2$  は東京化成工業より入手した. メタノール, ヘキサン, クロロホルム, ギ酸アンモニウムは和光純薬より入手した.

### 3-2-2. CPFAEs の定量を行った油脂サンプル

Crude Palm Oil は PALMAJU EDIBLE OIL Sdn. Bhd. より分与頂いたものを使用した. この Crude Palm Oil の MAG, DAG, TAG の組成比はそれぞれ MAG <1%, DAG 6.9%, TAG 93.1% であった. この組成比は LC-RI を用いて分析を行った. YMC-Pack ODS-A (250 mm × 4.2 i.d., 5  $\mu\text{m}$ , YMC Co., Ltd.) を分離カラムに使用し, カラムオープン温度は 25°C に設定した. アイソクラティックによる分離を行い, 流速は 0.9 mL/min とした. LC-RI の移動相はアセトン/アセトニトリル = 8/2 (v/v) とした. 精製パーム油脂は前述の Crude Palm Oil をラボにて精製することで得た. Crude Palm Oil の精製条件は下記の通りである. まず 500 g の Crude Palm Oil に対して 7.5 g の活性白土を添加し, 110°C, 20 mmHg の条件で 10 分間脱色操作を行った. 脱色操作終了後, 活性白土をろ紙にて除去した油脂を全量脱臭操作に供した. 脱臭操作は 2 mmHg, 250°C の条件で 90 分間実施した. 90 分の間に水蒸気を 25 g 吹き込んだ. 脱臭処理が終了後, 油脂を 80°C 以下まで冷却されたことを確認した後, 真空状態を解除し油脂を回収した.

### 3-2-3. 油脂サンプルの加熱処理

FeCl<sub>2</sub> を添加する試験区のサンプルは下記のように調製した。まず 100 mg/mL の濃度の FeCl<sub>2</sub> -メタノール溶液を調製した。本溶液を Phyrex アンプルに 10 µl 添加した後、メタノールを蒸発させた。続いて、この Phyrex アンプルに脂質を 10 mg 添加し、N<sub>2</sub> ガスでヘッドスペース部を置換した後、ガスバーナー (Style Index CO., LTD.) を用いて封管した。封管した Phyrex アンプルはマッフル炉 (NITTO KAGAKU CO., LTD.) を用いて 250°Cにて 90 分間加熱処理を行った。

FeCl<sub>2</sub> を添加しない試験区のサンプルは下記のように調製した。Phyrex アンプルに脂質を 10 mg 添加し、N<sub>2</sub> ガスでヘッドスペース部を置換した後、ガスバーナー (Style Index CO., LTD.) を用いて封管した。封管した Phyrex アンプルはマッフル炉 (NITTO KAGAKU CO., LTD.) を用いて 250°Cにて 90 分間加熱処理を行った。処理後の各脂質サンプルを 1 mL のクロロホルムに溶解した。続いて、本希釈溶液をヘキサンにて 10 倍に希釈した。最後に、本検液に内部標準物質として PPCl-d5 を 100 µg/mL の濃度になるよう添加した。本検液を試験用液とした。検液中の脂質濃度は 1 mg/mL となる。

### 3-3. 結果・考察

#### 3-3-1. 油脂サンプルの加熱処理法の構築

第二章にて、SFC/MS を用いた CPFAEs 分析系の構築を行うことが出来た。そこで第三章では、構築した分析系の有用性を示すために、構築した分析系を用いて CPFAEs 生成に関する新たな知見の取得を試みた。これまでも CPFAEs の生成に関する研究が試みられてきたが、これまでの研究は問題点を抱えたものであった。最も問題とされた点は、多様な化合物が様々な濃度で混在している食用油脂をサンプルに用いている点である。そこで本研究では、より単純な試験系で検討を行うことで、CPFAEs の生成に関する知見を得ようと試みた。つまり、単一の脂質と塩素化合物を高温で処理することで生成する CPFAEs のプロファイリングを行うこととした。本研究では塩素化合物として  $\text{FeCl}_2$  を添加している。これは過去の研究にて塩素化合物として使用された実績 (20) があることから、本研究においても  $\text{FeCl}_2$  を塩素化合物として使用することとした。

CPFAEs は、パーム油脂の製造工程における脱臭操作時に生成することが、過去の研究にて明らかになっている (19)。よって検討を始める前に、本検討で用いたサンプル調製法が、パーム油脂の製造工程における脱臭操作の環境を再現できているかの確認を行った。再現できているかについては、塩素化合物を添加せずに 3-2-4 で示した処理を経た Crude Palm Oil 中の CPFAEs の分析結果が、実際の精製操作を経て製造されたパーム油脂中の CPFAEs の分析結果と一致しているかで判断した。各サンプルの分析結果を表 8 に示す。実際の精製操作を経て製造されたパーム油脂から検出された CPFAEs は  $\text{PPCl} + \text{PCIP}$ ,  $\text{OOCl}$ ,  $\text{OCIO}$ ,  $\text{PLCl}$ ,  $\text{OLCl}$ ,  $\text{POCl}$  であり、その合計量は  $15.7 \text{ nmol/g}$  であった。一方で、3-2-4 で示した処理を経た Crude palm oil から検出された CPFAEs は  $\text{PPCl} + \text{PCIP}$ ,  $\text{OOCl}$ ,  $\text{OCIO}$ ,  $\text{PLCl}$ ,  $\text{OLCl}$ ,  $\text{POCl}$  であり、その合計量は  $16.8 \text{ nmol/g}$  で

あった。各化合物の定量結果もほぼ同等となったことから、今回設定したサンプル処理方法は、実際の精製工程における脱臭工程の環境を再現できていると判断した。

表 8 塩素化合物を添加せず 3-2-4 の処理を行った Crude palm oil と、実際の精製操作を経て製造されたパーム油脂中の CPFAEs の分析結果

	実際の精製操作を経て製造されたパーム油脂	塩素化合物を添加せずに、加熱処理を行った Crude Palm Oil
POHCl	n.d.	n.d.
OHPCl + PCIOH	n.d.	n.d.
PPCl + PCIP	5.59 ± 0.15	6.23 ± 0.64
OOHCl	n.d.	n.d.
OHOC1 + OCIOH	n.d.	n.d.
OOCl	2.40 ± 0.08	3.16 ± 0.96
OCIO	1.49 ± 0.14	1.30 ± 0.25
PLCl	n.q.	n.q.
OLCl	n.q.	n.q.
POCl	6.19 ± 0.25	6.15 ± 1.21
SOC1	n.d.	n.d.
PSC1	n.d.	n.d.
Sum	15.67	16.84

(nmol/g) ( $n = 3$ )

n.d. : not detected

n.q. : not quantitated

### 3-3-2. 単一の脂質から生成する CPFAEs の評価

3-3-1 にて構築したサンプル処理法を用いて、単一の脂質と塩素化合物を高温で処理することで生成する CPFAEs のプロファイリングを行った。まず始めに、脂質標準品と塩素源を反応させた場合に生成する CPFAEs の定量を行った。用いた脂質標準品は、MAG としてモノパルミチン、モノオレイン、DAG としてジパルミチン、ジオレイン、TAG としてトリパルミチン、トリオレインの 6 種を準備した。それぞれのサンプルから検出された CPFAEs の定量結果を、表 9 に示している。

全ての脂質において、 $\text{FeCl}_2$  を添加して反応させた場合、添加せずに反応させた場合と比較して生成する CPFAEs が大幅に増加していることが確認できる。本結果に関してはこれまで報告されてきた、CPFAEs は脂質と塩素化合物を高温にて反応させることで生成するという結果と一致する (17,18)。一方で、生成する CPFAEs の分子種のプロファイルは、反応に用いた脂質の種類によって異なる結果となった。例えば、モノオレイン、ジオレイン、トリオレインと塩素化合物を反応させた場合に生成する CPFAEs を比較する。モノオレインからは、CP 脂肪酸モノエステルである  $\text{OOHCl}$ ,  $\text{OHOCi}$ ,  $\text{OCiOH}$  が主な生成物であった。ジオレインの場合、同じく CP 脂肪酸モノエステルである  $\text{OOHCl}$ ,  $\text{OHOCi}$ ,  $\text{OCiOH}$  が主な生成物であったが、CP 脂肪酸ジエステルである  $\text{OOCl}$ ,  $\text{OCiO}$  も生成していることが確認できる。さらにトリオレインの場合は、CP 脂肪酸ジエステルである  $\text{OOCl}$ ,  $\text{OCiO}$  が主な生成物であった。以上の結果から、MAG と塩素化合物が反応した際は CP 脂肪酸モノエステルが、DAG が塩素化合物と反応した際は CP 脂肪酸モノエステルと CP 脂肪酸ジエステルが、そして TAG が塩素化合物と反応した際は CP 脂肪酸ジエステルが生成することが明らかになった。この傾向は、モノパルミチン、ジパルミチン、トリパルミチンの場合

も同様であった。CPFAEs は当初、MAG や DAG と塩素化合物が反応することにより生成するとされてきた (21)。ところが近年報告された Zhang らの研究では、MAG や DAG だけでなく、TAG からも CPFAEs が生成するとしている (62)。本研究における結果は、Zhang らの研究の結果を支持するものである。さらに本研究では、Zhang らの研究で明らかになった知見に定量的な考察を加えることが出来ている。つまり、どの脂質からどの CPFAEs がどれだけ生成するのかについて議論を行うことが出来ている。定量的な考察については Zhang らの研究では実施されていない。これは、彼らの研究で用いられた分析手法が CPFAEs の各分子種の分析を主眼に置いたものではない為である。本研究における検討の結果、前述の通り反応させる脂質の種類により生成する CPFAEs のプロファイルが異なるということが明らかになった。図 18 に本項の検討結果の概要を示している。

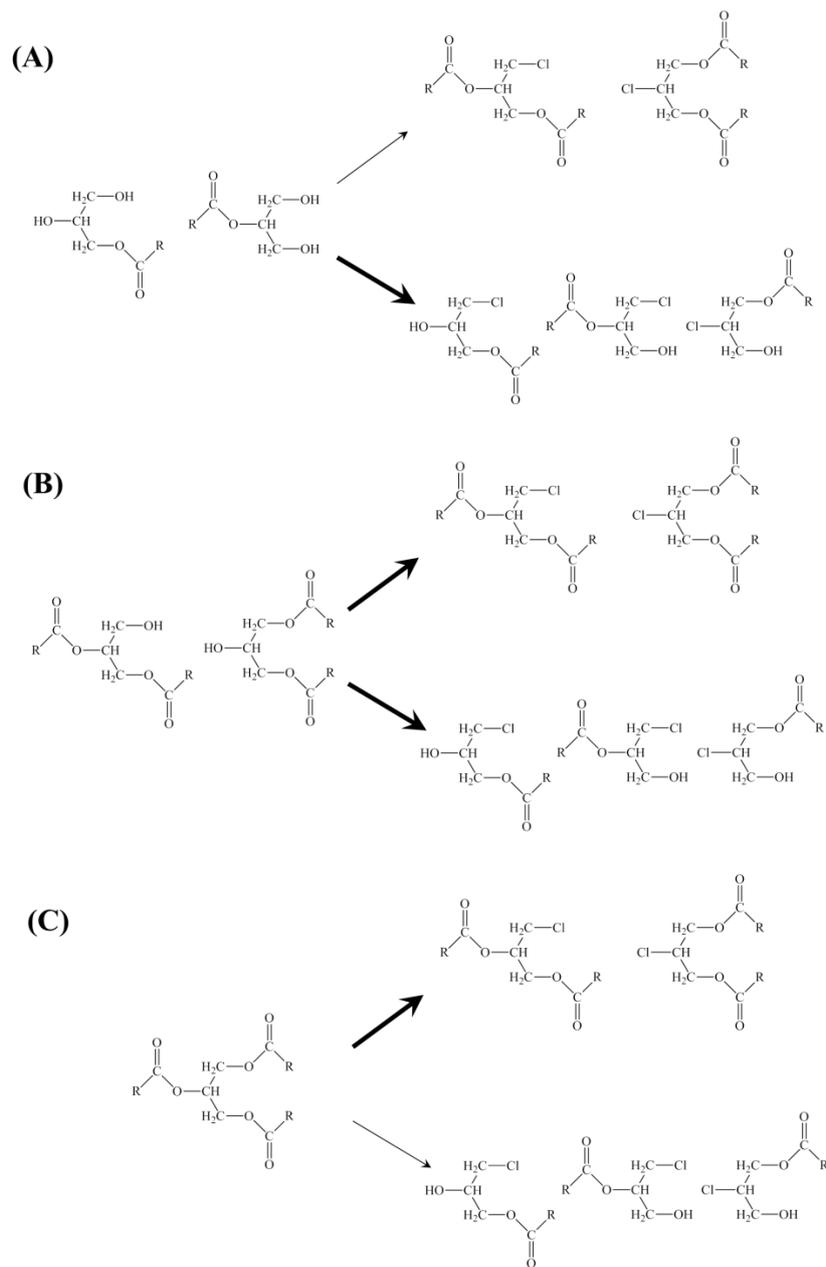


図 18 本項の検討結果の概要

(A) MAG と塩素化合物が反応した場合は CP 脂肪酸モノエステルが主に生成する．(B) DAG と塩素化合物が反応した場合は CP 脂肪酸モノエステルとジエステルが共に生成する．(C) TAG と塩素化合物が反応した場合は CP 脂肪酸ジエステルが生成する．

定量の結果, モノオレインから生成された CPFAEs の合計は  $0.58 \mu\text{mol/g}$ , ジオレインから生成された CPFAEs は  $1.89 \mu\text{mol/g}$ , トリオレインから生成された CPFAEs は  $0.79 \mu\text{mol/g}$  であった. また, モノパルミチンから生成された CPFAEs は  $1.74 \mu\text{mol/g}$ , ジパルミチンから生成された CPFAEs は  $2.23 \mu\text{mol/g}$ , トリパルミチンから生成された CPFAEs は  $0.80 \mu\text{mol/g}$  であった. DAG と塩素化合物を反応させた場合が, 最も CPFAEs が多く生成していた. 本結果はこれまでの結果と同様である (21).

トリオレインと塩素化合物を反応させた場合, OOCI と OCIO が生成されていることが確認できた. OOCI と OCIO は位置異性体の関係にある. OOCI と OCIO の定量の結果,  $0.50 \mu\text{mol/g}$  と  $0.28 \mu\text{mol/g}$  であり, その比率は約 2:1 であった. 過去の研究の中で, 精製後の 3-MCPD と 2-MCPD 脂肪酸エステルの比は 2:1 であることが報告されている (63, 64). よって本研究におけるこの結果は, 過去の研究にて報告された結果と一致するものである.

表 9 3-2-3 の処理を行った脂質標準品中の CPFAEs

	モノパルミチン		ジパルミチン		トリパルミチン	
	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加
POHCl	n.q.	375.73 ± 6.08	n.q.	708.17 ± 45.45	n.d.	8.09 ± 0.37
OHPCl + PCIOH	n.d.	141.61 ± 6.88	n.d.	284.53 ± 36.15	n.d.	n.q.
PPCl + PCIP	n.q.	57.48 ± 1.60	n.q.	275.41 ± 11.17	n.d.	633.85 ± 47.65
OOHCl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OHOC1 + OCIOH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OOC1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OCIO	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

	モノオレイン		ジオレイン		トリオレイン	
	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加	FeCl <sub>2</sub> 無添加	FeCl <sub>2</sub> 添加
POHCl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OHPCl + PCIOH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PPCl + PCIP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OOHCl	n.q.	119.64 ± 3.84	n.q.	475.17 ± 7.53	n.d.	n.d.
OHOC1 + OCIOH	n.q.	70.13 ± 4.62	n.q.	295.14 ± 22.63	n.d.	n.d.
OOC1	n.q.	9.78 ± 1.91	14.00 ± 0.81	246.40 ± 14.16	n.q.	445.91 ± 10.24
OCIO	n.q.	6.46 ± 0.44	6.26 ± 0.51	155.53 ± 9.80	n.q.	250.88 ± 5.49

(μmol/mol) (n = 3)

n.d. : not detected

n.q. : not quantitated

### 3-3-3. パーム油脂から生成する CPFAEs の評価

最後に、Crude Palm Oil と塩素化合物を 3-2-4 にて示した手法にて反応させ、生成した CPFAEs の定量を行った (図 19, 表 10). 定量の結果、生成された CPFAEs の 97% は CP 脂肪酸ジエステルであった. 前述の MAG, DAG, TAG を用いた検討の結果から、MAG からは CP 脂肪酸モノエステルが、DAG からは CP 脂肪酸モノエステルと CP 脂肪酸ジエステルが、そして TAG からは CP 脂肪酸ジエステルが生成することが明らかになった. Crude Palm Oil 中の MAG や DAG が反応して CPFAEs が生成しているのであれば、CP 脂肪酸モノエステルが生成されるはずである. ところが今回の結果では、生成した CPFAEs 中の CP 脂肪酸モノエステルの割合は 3% であるのに対し、CP 脂肪酸ジエステルは 97% であった. そのため、本サンプル中の CPFAEs は、Crude Palm Oil 中の TAG と塩素化合物が反応し生成したと考えられる. 以上の検討の結果から、実際の製造工程にて製造されたパーム油脂中の CPFAEs の多くは、油脂中の TAG と塩素化合物が反応し生成していると考えられる.

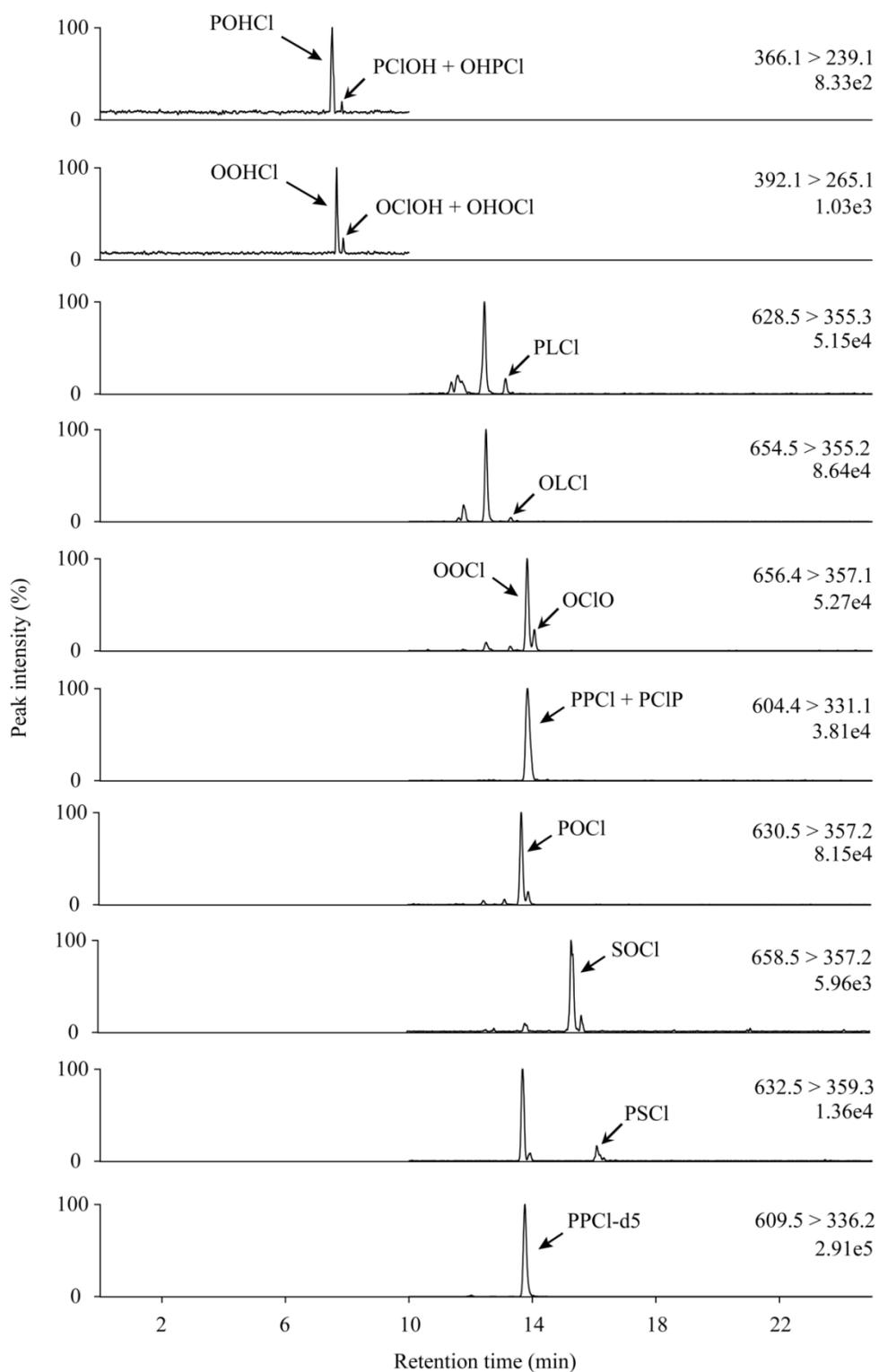


図 19 3-2-3 に示した手法で処理を行った **Crude Palm Oil** を分析した結果得られた **MRM** クロマトグラム

表 10 3-2-3 の処理を行った Crude Palm Oil 中の CPFAEs

	FeCl <sub>2</sub> 0 ppm	FeCl <sub>2</sub> 100 ppm
POHCl	n.d.	n.q.
OHPCl + PCIOH	n.d.	n.q.
PPCl + PCIP	6.23 ± 0.64	27.77 ± 5.96
OOHCl	n.d.	2.64 ± 0.83
OHOC1 + OCIOH	n.d.	1.32 ± 0.26
OOC1	3.16 ± 0.96	24.29 ± 1.98
OCIO	1.30 ± 0.25	12.66 ± 1.13
PLCl	n.q.	0.65 ± 0.10
OLCl	n.q.	11.88 ± 2.23
POCl	6.15 ± 1.21	52.72 ± 6.20
SOCl	n.d.	n.q.
PSCl	n.d.	2.54 ± 0.25
Sum	16.84	136.47

FeCl<sub>2</sub> 0 ppm : 塩素化合物を添加せずに 3-2-4 の処理を行った場合の結果

FeCl<sub>2</sub> 100 ppm : 塩素化合物を添加して 3-2-4 の処理を行った場合の結果

n.d. : not detected

n.q. : not quantitated

### 3-4. 小括

本章では構築した分析系の有用性を示すべく、脂質と塩素化合物の反応に関する知見を得ることを試みた。そのため、パーム油脂の製造工程を再現した *in vitro* 試験にて得られた油脂サンプル中の CPFAEs のプロファイリングを試みた。脂質標準品と塩素化合物を反応させた結果、MAG からは CP 脂肪酸モノエステルが、DAG からは CP 脂肪酸モノエステルと CP 脂肪酸ジエステルが、そして TAG からは CP 脂肪酸ジエステルが生成することが明らかになった。さらに、Crude Palm Oil と塩素化合物を反応させると、CP 脂肪酸ジエステルが主に生成された。この結果から、パーム油脂中に含まれている CPFAEs は、TAG と塩素化合物が反応することで生成することが示唆された。

これまでの研究では、CPFAEs の前駆体は MAG や DAG であるとされてきた。これは、油脂中の CPFAEs の挙動を詳細に追うことのできない分析系を用いて検討を行った結果である。例えば清水らの報告 (21) でも、CPFAEs の前駆体は DAG であると結論付けられている。彼らの研究で使用されていた分析系は、緒論で述べた GC/MS を用いたものであり、CPFAEs とグリシドールを合わせて評価している可能性がある。本研究で得た知見は、このような誤った解釈を正す一助になると考えられる。

## 第四章 総括

本研究では、パーム油脂中の CPFAEs を精密分析可能な分析系構築をめざし、種々の検討を行った。CPFAEs の精密分析系は、CPFAEs の前駆体や生成機構の解明、代謝挙動の解明といった CPFAEs に関する検討を行う上で必要であり、その開発を CODEX, EFSA, そして日本の農林水産省が推奨している。

これまで構築されてきた LC/ESI MS を用いた分析系では、固相抽出によりサンプル中の夾雑物の除去を行った後、分析を実施するのが一般的である。これは Haines らの検討を踏まえ、CPFAEs 以外の化合物、特に低極性化合物である TAG を除去することが、LC/ESI MS を用い安定的に CPFAEs の定量を行う上で重要とされてきたためである。

LC/ESI MS を分析装置として用いた分析系では、CPFAEs の脂肪酸分子種を個々に評価できることが利点である。ところが、CPFAEs の内、脂肪酸が 1 つ結合したモノエステルと、脂肪酸が 2 つ結合したジエステルでは、その極性が大きく異なるため、逆相 LC では同一分析系において良好に分離を行うことは困難であった。例えば、各ピークの形状を良好にしようとした場合、モノエステル各分子種、及びジエステル各分子種の分離が不十分となってしまう。反対に、モノエステル各分子種、及びジエステル各分子種をそれぞれ良好に分離しようとした場合、溶出ピークがブロードになる。

さらに、サンプルの希釈溶媒の組成についても問題になる。LC にて分析を行う際は、一般的にサンプルの希釈溶媒の組成は LC 移動相の初期溶媒組成と同じか、もしくは溶出力の弱い溶媒組成にすることが望ましいとされている。移動相の溶媒組成よりも溶出力の強い希釈溶媒を使用した場合、分析対象化合物がカラムの固定相に保持さず、ピークがブロードになる。加えて、分析対象化合物がカラムの導入部で濃縮されないため、検出感度の低下を招くことになる。

LC を分離系に使用した CPFAEs 分析系では、移動相の初期溶媒はメタノール、アセトニトリル、水を任意の割合で混合した組成であるのに対し、サンプルの希釈溶媒にはイソプロパノールやジクロロメタン等が使用されてきた。CPFAEs の内、CP 脂肪酸ジエステルはメタノールやアセトニトリルには溶解しない為、上記のような組成の希釈溶媒を使用せざるを得ない。そのため、サンプルの希釈溶媒の組成と LC の移動相の組成のギャップが生じ、ピークの形状の悪化を引き起こしている。2011 年に初めて報告された LC を分離系に据えた CPFAEs 分析系は、これまでに多くの改良が行われてきたが、上記の課題を克服するためには LC と異なる分離系が求められた。そこで本研究では逆相 LC よりも疎水性化合物の分離に優れ、かつ幅広い分離モードを有する分離系の適用を試みた。

第二章ではまず、分離系として低極性化合物の分離・分析に有用な SFC を使用した CPFAEs 分析系の構築を試みた。検討の結果、15 種の CPFAEs について分析対象化合物と、他の分析対象化合物の同位体イオンが共溶出することのない分離系を構築することが出来た。本検討では、化学結合基に C30 を有したカラムを二本直列に結合し分離を行った。本検討で使用したカラムの場合、化合物の分離にはカラムの化学結合基に加えて、残存シラノールとの相互作用が大きく影響していると考えられた。このようにカラムの分離特性が顕著に得られた背景として、SFC の移動相に使用している SCCO<sub>2</sub> の特性が挙げられる。SCCO<sub>2</sub> は、LC の移動相に使用している液体溶媒と比較して拡散性が高い。そのため、カラムの化学結合基が速やかに立ち上がり、分析対象化合物が化学結合基の根元に存在している残存シラノールと直ちに相互作用できるようになると考えられた。さらに、LC と比較して移動相に使用する極性溶媒量が少ない。そのため、カラムに残存しているシラノール基と CPFAEs が有する OH 基の相

相互作用が LC の場合と比較して強くなる。このように、SCCO<sub>2</sub> を移動相に使用する SFC は、LC と比較して使用するカラムの特性が分離挙動に強く現れるという性質を有している。本研究にて選択した C30 カラムは疎水性化合物を強く保持する、化合物の立体構造の違いを認識する、残存シラノールとの相互作用による OH 基認識能といった特性を有している。これら特性を利用することにより、分析対象化合物として選択した 15 種の CPFAE 分子種を良好に分離できたと考えられる。さらに LC の場合、分離カラムを二本直列に連結し分析を実施すると背圧が高くなる。一方 SFC の場合、移動相に使用している SCCO<sub>2</sub> 粘性が低い為、分離カラムを二本直列に連結した場合でも分析が実施可能となる。

このように、SFC の特性を活かすことにより、既存の分析系と同程度の検出感度を有し、サンプルの希釈溶媒の影響なく、かつ固相抽出の必要がない分析系が構築できた。本章における検討の結果から、CPFAEs 分析系に SFC を分離系として適用できることが確認された。

本研究では、パーム油脂で生成する CPFAEs を分析対象とし、分析系の構築を行ったが、他の油脂種に対応した分析系を構築することも可能である。今回、多種多様な分子種が存在する CPFAEs の内、パーム油脂から生成する CPFAEs のみを選定する為に、2-3-1 で示したスクリーニングを実施した。例えば、スクリーニングを行う油脂を菜種油や大豆油等、他の油脂種に変更することで、様々な油脂に対応した分析系を構築することが出来ると考えられる。

続いて第三章では、構築した分析系の有用性を示すべく、脂質と塩素源の反応に関する知見を得ることを試みた。そのため、パーム油脂の製造工程を再現した *in vitro* 試験にて得られた油脂サンプル中の CPFAEs のプロファイリングを試みた。脂質標準品と塩素源を反応させた結果、パーム油脂中に含まれている CPFAEs は、TAG と塩素化合物が反応することで生成することが示唆された。

これまでの研究では, CPFAEs の前駆体は MAG や DAG であるとされており, 本研究で得た知見は, このような誤った解釈を正す一助になると考えられる.

最後に, CPFAEs に関する研究の中における, 本研究の意義について述べる. CPFAEs 精密分析系の開発の意義については, 緒論で述べたとおりであり, 日本においても農林水産省がその開発研究を推奨している. これは CPFAEs 精密分析系が, ヒトの体内での代謝挙動把握や, 生成機構の解明等に必要不可欠である為である. これまでも, 複数の研究グループが上記の研究を遂行してきた. 例えば, 清水ら (21) や Destailats ら (27) は生成機構の解明を, Nagy らは前駆体の解明, Matthäus ら (65) や Bornscheuer ら (66) は低減法の開発, そして Abraham ら (67) はラットを用いて CPFAEs の体内挙動解明を試みている. ただし, これら研究の全てにおいて共通するのは, CPFAEs を分子種ごとに精密に分析できていない点である. 清水らは生成機構解明の為に検討を行っているが, 評価系は GC/MS を用いたものであり, CPFAEs の分子種に関する情報の取得を行えていない (21). また, Destailats らについても同様に, 生成機構に関する検討を行っている (27). 彼らは LC/MS を用い, CPFAEs 分子種に関する情報の取得を試みているが, 標準品を用いず検討を実施している為, 各 CPFAEs に関する量の評価を行っていない. また, Abraham らは, ラットを用いた CPFAEs の代謝挙動の解明を試みているが, 彼らの評価系も GC/MS を用いたものである. さらに CP の内, 3-MCPD のみ評価しており, その代謝産物については未評価である. このように, 得られた結果が限定的であるため, そこから導かれる結論についても限定的であった.

本研究にて提唱した SFC を分離系として選択した分析系は, 分析サンプルの調製条件に影響されず CPFAEs を分子種ごとに精密分析できるため, 上記の研究における問題点を解消するものである. さらに本分析系では, サンプルの前

処理を行う必要がない。これまで提唱されてきた LC を分離系に選択した分析系では、サンプルの前処理として固相抽出により TAG をはじめとした低極性化合物の除去を行ってきた。ところが、TAG をはじめとした低極性化合物を夾雑物として除去した場合、これらの情報が失われるという欠点がある。前述の通り、CPFAEs は中性脂質と塩素が共存した状態で、これら化合物を高温で処理することにより生成するとされている。CPFAEs の生成メカニズムを明らかにするうえで、生成した CPFAEs の分子種及びその生成量だけでなく、反応前後の TAG をはじめとした脂質の挙動も把握することは極めて重要である。さらに、代謝挙動の解明においても、CPFAEs に加えその代謝産物の分析が求められる。本研究にて構築した分析系は固相抽出によるサンプルの精製を必要としないため、CPFAEs の前駆体や代謝産物の挙動も同時に評価することが出来る可能性を秘めている。以上のことを踏まえ、本研究にて構築した CPFAEs 分析系は、CPFAEs に関する広範な研究に適用できる、有用な分析系であると言える。

## 謝辞

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻において行った研究をまとめたものある。

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました本学 福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、懇切丁寧なご指導を賜りました九州大学生体防御医学研究所兼大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 馬場健史教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文を精読頂き有用なご助言を賜りました本学 村中俊哉教授ならびに藤山和仁教授に心より感謝申し上げます。さらに、日頃より暖かいご援助を賜りました本学 新聞秀一准教授、小野比佐好元助教に深く感謝するとともに、実験の細部にわたり丁寧にご指導くださいました九州大学生体防御医学研究所兼大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 和泉自泰准教授に心より感謝致します。

本研究の遂行に当たりご助力頂きました、不二製油株式会社 木田晴康研究開発本部長、横溝太油脂開発室長、岡田忠幸油脂開発室阪南グループリーダー、津村和伸未来創造研究所蛋白研究室長、有島利治博士、坪井成緒氏に厚く御礼申し上げます。中でも、津村和伸未来創造研究所蛋白研究室長には本研究の遂行及び論文執筆等多岐にわたりご指導賜りました。

本研究を行うに際し、日ごろの多大なるご協力を賜りました当該研究室の諸先輩方、同輩、後輩ならびにスタッフの皆さまに心から感謝いたします。中でも、松原惇起博士（現京都大学医学部附属病院）、内方崇人博士（現株式会社島津製作所）、石橋愛実博士、田口歌織博士、山田貴之博士には日頃より議論や助言をしていただくなど多大なるご協力を賜りました。

最後に、常日頃より生活面や精神面を支えてくれた妻はもちろん、親族の皆

さま，友人方無くして本研究の遂行は成し得なかったことを付記いたします．

## 引用文献

(1) National nutrient database for standard reference release 28

United states department of agriculture agricultural research service

<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/661?fg=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=>

(2) **Oil World Annual 2015** ; ISTA Mielke GmbH, 29 May 2015

(3) **Forster, A., Harper, A. J.,** ; Physical refining, J. Am. Oil Chem. Soc., **60**, 265–271 (1983).

(4) **Frank, E. S.,** ; Steam refining, J. Am. Oil Chem. Soc., **53**, 358-360 (1976).

(5) **Petrauskaitè V., De Greyt, W. F., Kellens, M. J.,** ; Physical refining of coconut oil: Effect of crude oil quality and deodorization conditions on neutral oil loss, J. Am. Oil Chem. Soc., **77**, 581-585 (2000).

(6) **Velisek, J., Davidek, J., Kubelka, V., Janicek, G., Svobodova, Z., Simicova, Z.,**; New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates, J. Agric. Food Chem., **28**, 1142-1144 (1980).

(7) **BfR Opinion,**; Infant formula and follow-up formula may contain harmful 3-MCPD fatty acid esters, No. 047/2007, 11 December (2007).

[http://www.bfr.bund.de/cm/349/infant\\_formula\\_and\\_follow\\_up\\_formula\\_may\\_contain\\_harmful\\_3\\_mcpd\\_fatty\\_acid\\_esters.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/349/infant_formula_and_follow_up_formula_may_contain_harmful_3_mcpd_fatty_acid_esters.pdf)

(8) 平成 26 年 12 月 17 日農林水産省消費・安全局，食品中の 3-MCPD 脂肪酸エステル及びグリシドール脂肪酸エステルの含有実態調査の結果について（平成 24, 25 年度）

(9) **Zelinkova, Z., Svejkovska, B., Velisek, J., Dolezal, M.,** ; Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils, Food Addit.Contam., **23**, 1290-1298 (2006).

- (10) **Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, FP., Stadler, RH.,** ; Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD, *Food Addit. Contam.*, **25**, 391-400 (2008).
- (11) **Küsters, M., Bimber, U., Ossenbrüggen, A., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., Gerhartz, M.,** ; Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6570-6577 (2010).
- (12) **Razak, R., Kuntom, A., Siew, W., L., Ibrahim, N., A., Ramli, M., R., Hussein, R., Nesaretnam, K.,** ; Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils, *Food Control*, **25**, 355–360 (2012)
- (13) **Liu, M., Gao, B. Y., Qin, F., Wu, P. P., Shi, H. M., Luo, W., Ma, A. N., Jiang, Y. R., Xu, X. B., Yu, L. L.,** ; Acute oral toxicity of 3-MCPD mono- and di-palmitic esters in Swiss mice and their cytotoxicity in NRK-52E rat kidney cells, *Food Chem Toxicol.*, **50**, 3785-3791 (2012)
- (14) **Barocelli, E., Corradi, A., Mutti, A., Petronini, P., G.,** ; Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study, Scientific report submitted to EFSA, CFP/EFSA/CONTAM/2009/01 (2011).
- (15) **Onami, S., Cho, Y., M., Toyoda, T., Mizuta, Y., Yoshida, M., Nishikawa, A., Ogawa, K.,** ; A 13-week repeated dose study of three 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in F344 rats, *Archives of Toxicol.*, **88**, 871-880 (2014)
- (16) **Alinorm 08/31/41**(2008) ;  
[http://www.codexalimentarius.net/download/report/700/al31\\_41e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/700/al31_41e.pdf)
- (17) **European commission**.; Opinion of the scientific committee on food on 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD), SCF/CS/CNTM/OTH/17 Final, Brussels,

Belgium (2001) (accessed October 2015),

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out91\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out91_en.pdf)

(18) 農林水産省消費・安全局長, 農林水産省農林水産技術会議事務局長, 27 消費安全第 1841 号, 27 農会第 616 号, 平成 27 年 6 月 19 日, レギュラトリーサイエンス研究推進計画の策定について

(19) **Franke, K., Strijowski, U., Fleck, G., Pudel F.,** ; Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloro-1,2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil, *LWT*, **42**, 1751-1754 (2009).

(20) **Destailats, F., Craft, B. D., Sandoz, L., Nagy, K.,** ; Formation mechanisms of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions, *Food Addit. Contam.*, **29**, 29-37 (2012).

(21) **Shimizu, M., Vosmann, K., Matthäus, B.,** ; Generation of 3-monochloro-1,2-propanediol and related materials from tri-, di-, and monoolein at deodorization temperature, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **114**, 1268-1273 (2012).

(22) **Freudenstein, A., Weking, J., Matthäus, B.,** ; Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **115**, 286-295 (2013).

(23) **Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., Matthäus, B.,** ; Influence of chloride and glycidyl-ester on the generation of 3-MCPD- and glycidyl-esters, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **115**, 735-739 (2013).

(24) **Nagy, K., Sandoz, L., Craft, B. D., Destailats, F.,** ; Mass-defect filtering of isotope signatures to reveal the source of chlorinated palm oil contaminants, *Food Addit. Contam.*, **28**, 1492–1500 (2011).

(25) **Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., Freudenstein, A.,** ; Strategies

for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils, Eur. J. Lipid Sci. Technol., **113**, 380-386 (2011).

(26) **Craft, B. D., Nagy, K., Sandoz, L., Destailats, F.,** ; Factors impacting the formation of Monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters during palm (*Elaeis guineensis*) oil production, Food Addit. Contam., **29**, 354-361 (2012).

(27) **Destailats, F., Craft, B. D., Sandoz, L., Nagy, K.,** ; Formation mechanisms of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions, Food Addit. Contam., **29**, 29-37 (2012).

(28) **Weißhaar, R.,** ; Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide, Eur. J. Lipid Sci. Technol., **110**, 183-186 (2008).

(29) **Weißhaar, R., Perz, R.,** ; Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils, Eur. J. of Lipid Sci. and Technol., **112**, 158–165 (2010)

(30) **Miyazaki, K., Koyama, K., Sasako, H., Hirao, T.,** ; Indirect method for simultaneous determinations of 3-chloro-1,2-propanediol fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters, J. Am. Oil Chem. Soc., **89**, 1403-1407 (2012).

(31) **Koyama, K., Miyazaki, K., Abe, K., Ikuta, K., Egawa, Y., Kitta, T., Kido, H., Sano, T., Takahashi, Y., Nezu, T., Nohara, H., Miyashita, T., Yada, H., Yamazaki, K., Watanabe, Y.,** ; Optimization of an indirect enzymatic method for the simultaneous analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidyl esters in edible oils, J. Oleo Sci., **64**, 1057-1064 (2015).

(32) **Küsters, M., Bimber, U., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., Gerhartz, M.,** ; Simultaneous determination and differentiation of glycidyl esters and 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD) esters in different foodstuffs by GC-MS, J.

Agric. Food Chem., **59**, 6263-6270 (2011).

(33) **Xu, X., He, H., Zhu, Y., Feng, L., Ying, Y., Huang, B., Shen, H., Han, J., Ren, Y.,** ; Simultaneous determination of 3-monochloropropane-1,2-diol and acrylamide in food by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with coupled column separation, *Anal. Chim. Acta.*, **760**, 93–99 (2013).

(34) **Chung, S., Chan, B.,** ; Simultaneous Determination of 2- and 3-monochloropropan-1,3-diol esters in foods by enzymatic hydrolysis and GC–MS detection, *Chromatographia*, **75**, 1049-1056 (2012).

(35) **Ermacora, A., Hrcirik, K.,** ; Evaluation of an improved indirect method for the analysis of 3-MCPD esters based on acid transesterification, *J. Am. Oil Soc.*, **89**, 211-217 (2012).

(36) **Karasek, L., Wenzl, T., Ulberth, F.,** ; Determination of 3-MCPD esters in edible oil – methods of analysis and comparability of results, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 1433–1442 (2011).

(37) **Qing Liua, Q., Han, F., Xie, K., Miao, H., Wu, Y.,** ; Simultaneous determination of total fatty acid esters of chloropropanols in edible oils by gas chromatography–mass spectrometry with solid-supported liquid–liquid extraction, *J. Chromatogra. A*, **1314**, 208–215 (2013).

(38) **Ma, F., Li, P., Matthäus, B., Zhang, W., Zhang, Q.,** ; Optimization of ultrasonic-assisted extraction of 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD) and analysis of its esters from edible oils by gas chromatography–mass spectrometry, *J Sep Sci.*, **35**, 2241-2248 (2012).

(39) **Kuhlmann, J.,** ; Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**,

335–344 (2011).

(40) **Destailats, F., Craft, B. D., Dubois, M., Nagy, K.,** ; Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism, Food Chemistry, **131**, 1391–1398 (2012).

(41) **Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P., Collison, M. W.,** ; Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC–TOF MS, J. Am. Oil Chem. Soc., **88**, 1-14 (2011).

(42) **Yamazaki, K., Ogiso, M., Isagawa, S., Urushiyama, T., Ukena, T., Kibune, N.,** ; A new, direct analytical method using LC-MS/MS for fatty acid esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD esters) in edible oils, Food Addit. Contam., **30**, 52-68 (2013).

(43) **Dubois, M., Tarres, A., Goldmann, T., Empl, A. M., Donaubaauer, A., Seefelder, W.,** ; Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oil, J. Chromatogr. A, **1236**, 189-201 (2012).

(44) **MacMahon, S., Mazzola, E., Begley, T. H., Diachenko, G. W.,** ; Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 1. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol monoesters and glycidyl esters, J. Agric. Food Chem., **61**, 4737-4747 (2013).

(45) **MacMahon, S., Begley, T. H., Diachenko, G. W.,** ; Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 2. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol and 2-monochloropropanediol diesters, J. Agric. Food Chem., **61**, 4748–4757 (2013).

(46) **MacMahon, S., Ridge, C. D., Begley, T. H.,** ; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the direct detection of

2-monochloropropanediol (2-MCPD) esters in edible oils, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 11647–11656 (2014).

(47) **Hori, K., Koriyama, N., Omori, H., Kuriyama, M., Arishima, T., Tsumura, K.**, ; Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *LWT*, **48**, 204-208 (2012).

(48) **Bamba T., Shimonishi, N., Matsubara, A., Hirata, H., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Kobayashi A.**, ; A high throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460-469 (2008).

(49) **Matsubara, A., Bamba, T., Ishida, H., Fukusaki, E., Hirata, K.**, ; Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **32**, 1459-1464 (2009).

(50) **Hsieh, Y.**, Supercritical fluids and green bioanalysis, *Bioanalysis*, **2**, 1-4 (2010).

(51) **Lee J. W., Nagai T., Gotoh N., Fukusaki, E., Bamba, T.**, ; Profiling of regioisomeric triacylglycerols in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **966**, 193–199 (2014).

(52) **Lee, J.W., Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T.**, ; Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 262-268 (2012).

(53) **Uchikata, T., Matsubara, A., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T.**, ; Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 205-211 (2012).

- (54) **Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q10 by online supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogra A*, **1250**, 76-79 (2012).
- (55) **Taguchi, K., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; Simultaneous and rapid analysis of bile acids including conjugates by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1299**, 103–109 (2013).
- (56) **Taguchi, K., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1362**, 270–277 (2014).
- (57) **Uchikata, T., Matsubara A., Fukusaki, E., Bamba, T.** ; High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 69–75 (2012).
- (58) **Matsubara, A., Uchikata, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 782–787 (2012).
- (59) **Wada, Y., Matsubara, A., Uchikata, T., Iwasaki, Y., Morimoto, S., Kan, K., Okura, T., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; Metabolic profiling of  $\beta$ -cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **34**, 3564-3552 (2011).

- (60) **Ishibashi, M., Ando, T., Sakai M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1266**, 143-148 (2012).
- (61) **Hori, K., Tsumura, K., Fukusaki, E., Bamba, T.,** ; High-throughput analysis of sucrose fatty acid esters by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Mass Spectrometry*, **3**, 33-39 (2014)
- (62) **Zhang, Z., Gao, B., Zhang, X., Jiang, Y., Xu, X., Yu, L.,** ; Formation of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) di- and monoesters from tristearoylglycerol (TSG) and the potential catalytic effect of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ , *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 1839-1848 (2015).
- (63) **Alessia, E., Karel, H.,** ; Study on the thermal degradation of 3-MCPD esters in model systems simulating deodorization of vegetable oils, *Food Chem.*, **150**, 158-163 (2014).
- (64) **Alessia, E., Karel, H.,** ; Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1,3-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining, *Food Chem.*, **161**, 383-389 (2014).
- (65) **Matthäus, B., Pudel, F.,** ; Mitigation of 3-MCPD and glycidyl esters within the production chain of vegetable oils especially palm oil, *Lipid Technol.*, **25**, 151-155 (2013).
- (66) **Bornscheuer, U. T., Hesseler, M.,** ; Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its esters from oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 552–556 (2010).
- (67) **Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., Creutzenberg, O., Lampen, A.,** ; Relative oral bioavailability of 3-MCPD from

3-MCPD fatty acid esters in rats, Arch. Toxicol, **87**, 649-659 (2013).

本学位論文に關与する論文

**Katsuhito Hori, Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Kazunobu Tsumura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba,** ; High-throughput and sensitive analysis of 3-monochloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 99-104 (2012).

**Katsuhito Hori, Natsuko Hori-Koriyama, Kazunobu Tsumura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba,** ; Insights into the formation mechanism of chloropropanol fatty acid esters under laboratory-scale deodorization conditions, *J. Biosci. Bioeng.*, **online published** (2016).

その他原著論文

Atsushi Okazawa, Katsuhito Hori, Ryohei Okumura, Yoshihiro Izumi, Naoki Hata, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Eiichiro Ono, Honoo Satake, Akio Kobayashi, ; Simultaneous quantification of lignans in *Arabidopsis thaliana* by highly sensitive capillary liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry, Plant Biotechnology, **28**, 287-293 (2011).

Katsuhito Hori, Natsuko Koriyama, Hitomi Omori, Masamitsu Kuriyama, Toshiharu Arishima, Kazunobu Tsumura, Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, LWT - Food Science and Technology, **48**, 204-208 (2012).

Katsuhito Hori, Kazunobu Tsumura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, High-throughput analysis of sucrose fatty acid esters by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, Mass Spectrometry, **3**, 33-39 (2014).

## 学会発表

(国際会議)

○Katsuhito Hori, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Kazunobu Tsumura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba

High-throughput and sensitive analysis of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) fatty acid esters in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry

World Congress on Oleo Science (WCOS 2012) & 29th ISF Congress, Oct., 2012, Arkas Sasebo, Nagasaki

本発表は Outstanding Poster Presentation Award を受賞した.

(国内学会)

○堀遂人, 松原惇起, 内方崇人, 津村和伸, 福崎英一郎, 馬場健史

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析計を用いた食用油中の 3-MCPD 脂肪酸エステル類の高感度迅速分析法の開発

第 64 回日本生物工学大会, 2012 年 10 月, 神戸国際会議場

○堀遂人, 松原惇起, 内方崇人, 津村和伸, 福崎英一郎, 馬場健史

食用油脂中の 3-MCPD 脂肪酸エステル分析における超臨界流体クロマトグラフィー質量分析計の適用

第 62 回日本質量分析総合討論会 2014 年 5 月, ホテル阪急エキスポパーク

○堀遂人, 松原惇起, 内方崇人, 津村和伸, 福崎英一郎, 馬場健史

食用油脂中の 3-MCPD 脂肪酸エステル分析における超臨界流体クロマトグラフィー質量分析の適用

第 66 回日本生物工学大会, 2014 年 9 月, 札幌コンベンションセンター