

博士論文

2-/3-MCPD脂肪酸エステル類、グリシドール脂肪酸エステル類の
酵素的間接分析法の開発

宮崎（中村） 絹子

目次

本論文の要旨.	1-5
略語一覧.	6
第1章 緒論.	7-17
1.1 背景	7
1.2 分析法開発の動き	11
1.3 本研究の目的	16
第2章 酵素の間接分析法の開発.	18-54
2.1 序論	18
2.2 方法	19
2.3 結果と考察	33
2.4 まとめ	53
第3章 合同試験.	55-69
3.1 序論	55
3.2 方法	56
3.3 結果と考察	58
3.4 まとめ	69
第4章 魚油を対象とした酵素の間接分析法の改良.	70-85
4.1 序論	70
4.2 方法	70

4.3 結果と考察	73
4.4 まとめ	85
第5章 酵素の間接分析法の油脂含有食品への適用.	86-106
5.1 序論	86
5.2 方法	87
5.3 結果と考察	89
5.4 まとめ	106
総合討論.	107-111
引用文献.	112-119
謝辞.	120-121
論文目録.	122

本論文の要旨

1. 緒論

3-クロロ-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル類（3-MCPD-Es）及びグリシドール脂肪酸エステル類（G-Es）は、油脂の精製（主に脱臭工程）で生成することが近年明らかとなった新たなリスク物質である。リスク管理措置の必要性を検討するための基礎データを得るには、食用油脂中の3-MCPD-Es及びG-Esの分析法が必須であった。2007～2009年、ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）が3-MCPD-EsとG-Esの健康影響評価を公表した当初、油脂中の3-MCPD-Es、G-Esの主要な分析法として、ドイツ脂質科学会（DGF）標準法C-III 18 (09)が用いられていた。しかし、この方法は分析精度に問題があることや、分析中に分析種間の意図しない変換が生じることが指摘されたため、2010年以降には各国で、食用油脂を対象とした精度の高い分析法の開発が進められてきた。分析法は、直接分析法と間接分析法の2つに大別される。3-MCPD-EsやG-Esは結合する脂肪酸の種類、結合位置・数により、数十の類縁化合物が存在する。直接分析法は、各物質を区別して定量することができる。一方の間接分析法は、単一の物質に分解後、誘導体化してガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）にて分析する。脂肪酸の種類や結合位置・数に関わらず、3-MCPD-EsとG-Esを同時に定量出来るため、必要な標準試薬の種類も少なく、簡便である。現在、間接分析法はスクリーニング分析や品質保証に用いられている。

間接分析法のエステル型分析種の分解手法として、通常は酸性やアルカリ性条件下のメタノリシスが使われるが、3-MCPD-EsとG-Esは類似構造であり、pHの変化により容易に分析種間の意図しない変換が生じることが報告されていた。そのため、分析法開発の最重要課題は、3-MCPD-EsとG-Es間の意図しない変換を防いだ分解手法の確立であった。当時報告された間接分析法の多くは、意図しない変換を生じさせない穏やかなメタノリシス条件を見いだすことで、この課題を解決していた。2013年に米国油化学会（AOCS） Official Methodに登録されたCd29aは希硫酸、Cd29bは低濃度のアル

カリ、かつ低温 (-22~-28℃) と、穏やかな条件下において16時間かけてメタノリシスを行うため、GC-MS検液の調製に2日間を要する分析法であった。

本研究では、3-MCPD-EsとG-Esの分解手法としてリパーゼに着目し、食用油脂（植物油脂、動物油脂）及び脂質含有食品中の3-MCPD-Es、3-MCPD-Esの位置異性体である2-クロロ-1,3-プロパンジオール脂肪酸エステル類（2-MCPD-Es）、G-Esを精度良く、迅速に同時定量できる酵素的間接分析法の開発を目的として、研究を行った。さらに、国内に流通する食品の品質管理に活用できる方法とするため、複数機関による合同試験を実施し、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録を目指した。

2. 酵素的間接分析法の開発

食用油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの分析法の開発において、リパーゼによる加水分解手法を用いることで、精製・分析中の分析種間の意図しない変換を抑制し、かつGC-MS検液の調製が迅速である、酵素的間接分析法を開発することができた。3-MCPD-Es、G-Esは類似構造であるため、酸性、アルカリ性pHでは分析種間の意図しない変換が容易に生じることが報告されていた。本研究では、2つの理由からリパーゼを用いた加水分解に着目し、間接分析法の開発に着手した。1つ目は、リパーゼの多くは最適pHが中性付近にあり、極端な酸性、アルカリ性pHにせずつとも3-MCPD-Es、G-Esの分解を行うことができ、pH変化による分析種間の意図しない変換を抑制できることである。2つ目は、分解の迅速化である。リパーゼはその由来や反応条件によって、脂肪酸の種類と結合位置、等に対する反応特異性を有するため、基質に適したリパーゼの種類、反応条件を見いだすことは容易ではない。一方で、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esに対して分解特異性の高いリパーゼ及び適した加水分解条件を選定できれば、分解を迅速に完了できると考えた。検討の結果、油脂試料をイソオクタンに溶解し、*Candida cylindracea*（または、*C. rugosa*）由来のリパーゼ含有臭化ナトリウム（NaBr）水溶液（pH 5.0）中で室温、30分間振とうすることで、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esをそれぞれ3-MCPD、2-MCPD、グリシドールに加水分解する手法を見いだした。また、

分解後のリパーゼ含有NaBr水溶液を80℃、10分間加温することで、構造的に不安定なグリシドールを3-ブromo-1,2-プロパンジオール (3-MBPD) へと臭素化し、次いで、各遊離型分析種のフェニルボロン酸 (PBA) 誘導体化物をGC-MS分析することで、各分析種を同時に定量可能な酵素的間接分析法を開発した。

AOCS Official Method Cd29a、Cd29bのメタノリシスは、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの分解に16時間を要するのに対し、本分析法の加水分解は0.5時間で完了する。さらに、油種や油脂の物性、脂肪酸組成に関わらず、幅広い食用油脂（魚油を除く）に適用できることを明らかにした [Miyazaki, K et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **89**, 1403-1407 (2012), Koyama, K.; Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **64**, 1057-1064 (2015)] 。

3. 合同試験

市場に流通する食品の品質保証や、国内の含有実態調査に、迅速、かつ簡便な酵素的間接分析法を活用してもらうため、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録を目指した。登録の必要条件の1つである、「実用に供しうる室間再現精度を有すること」を確認するため、全13機関にて合同試験を実施した。合同試験用の油脂試料として、3-MCPD、2-MCPD、グリシドール相当濃度 0.61~4.64 mg/kgを含むパーム液体油、パーム固体脂、なたね油3種、米ぬか油を調製し、参加機関に配布した。本合同試験では、併行精度の相対標準偏差 (RSD_r) は1.8~8.4%、室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) は5.0~18.1%であり、酵素的間接分析法は十分な室間再現精度を有することが確認できた。さらに、2013年にAOCSが実施したOfficial Method 3法の合同試験において、遊離型相当濃度 1~11 mg/kgのパーム油を油脂試料として用いた場合の RSD_r は3.5~9.9%、 RSD_R は6.4~31.8%であったため、酵素的間接分析法はAOCSの合同試験結果と比べて同等以上であることが示された。合同試験結果により、酵素的間接分析法は十分な室間再現精度を有することを認められたため、2016年6月に日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法2.4.14-2016として登録された [Koyama, K.; Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **65**, 557-568 (2016)] 。

4. 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良

酵素的間接分析法の特徴である、*C. cylindracea*由来リパーゼを用いた2-/3-MCPD-Es、G-Esの加水分解は、他法と比べて迅速に完了する。一方で、*C. cylindracea*由来リパーゼはドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタン酸（EPA）に対する分解特異性が低いため、DHAが結合した3-MCPD、グリシドールの分解には不向きである。そのため、基準油脂分析試験法 基準法2.4.14-2016の適用範囲は、植物油脂と『魚油を除く』動物油脂である。DHAが結合した3-MCPD、グリシドールの分解に適したリパーゼの種類及び加水分解条件を検討した結果、①*Burckholderia cepacia*由来リパーゼの選定、②NaBrの添加を加水分解前から分解後に変更することにより、魚油を対象とした改良法を確立した。この方法は、日本油化学会 基準油脂分析試験法 奨7-2017（推奨法）として登録された[Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **66**, 1085-1093 (2017)]。

5. 酵素的間接分析法の油脂含有食品への適用

食用油脂を原料とした食品の製造・家庭調理中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態、油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの濃度を把握するためには、分析法の適用範囲を食用油脂から油脂含有食品にまで広げる必要がある。初めに、食用油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できる油脂含有食品群を確認した。油脂含有食品のうち、マヨネーズ、マーガリン、ファットスプレッド等の高脂質食品は酵素的間接分析法をそのまま適用できた。AOCSは、食用油脂を対象とするAOCS Cd29aに、前処理であるCd30-15を追加した分析法を報告した。高脂質食品14種を、酵素的間接分析法と、Cd30-15を追加したAOCS Cd 29aを用いて分析し、得られた分析値を比較したところ、同等であることが示された。一方、調製粉乳やルウのように、脂質濃度が比較的低く、副原料の多い食品は、酵素的間接分析法の精製では不十分であったことから、簡易な前処理法を追加した後、酵素的間接分析法で分析した。前処理の追加により、水溶性の食品成分を除去することができ、調製粉乳中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを分析できることを確認した。これらの結果より、高脂質食品の分析には、脂質抽出等を必要とせず、

油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できること、副原料の多い食品の分析には、酵素的間接分析法に簡易な前処理を追加することで適用できることを明らかにした [Miyazaki, K et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **93**, 885-893 (2016)]。

まとめ

本研究では、2-/3-MCPD-Es、G-Esの加水分解に*C. cylindracea*由来リパーゼを用いることにより、食用油脂（魚油を除く）及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを精度良く、かつ迅速に定量できる酵素的間接分析法を確立した。また、*C. cylindracea*のDHA、EPA等に対する分解特異性の低さにより、酵素的間接分析法の適用範囲外であった魚油に対しても、*Burkholderia cepacia*由来リパーゼを用いた改良法を確立できた。同時期に報告されたAOCS Official Method 3法のうち、Cd29a、Cd29bはメタノリシスのみに16時間を要する。Cd29cは、3-MCPD-EsとG-Esを同時分析できず、1試料につき2つの方法で分析する。酵素的間接分析法の加水分解は0.5時間で完了するため迅速であり、分析の補正には遊離型分析種- d_5 を用いるため、検量線用の標準試料は誘導體化以降の操作のみで済み、簡便である。そのため、作業効率が良く、食用油脂中の安全性評価等に用いる分析法として適した方法であると考えられる。複数機関による合同試験においては、油脂の物性や油脂中の2-/3-MCPD-Es、G-Es濃度の高低に関わらず、実用に供しうる空間再現精度を有することが認められたため、日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法として登録された。魚油を対象とした改良法は、基準油脂分析試験法の推奨法として登録された。油脂含有食品に関しては、さらに幅広い食品群を対象とした酵素的間接分析法の性能評価を今後実施し、未だ不明点が多い油脂含有食品の加熱（製造、家庭調理）による2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態把握の研究を行っていききたい。

今後も、食用油脂及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査、有害性の評価が進められるだろう。食品業界でも、自主的に、原料や製品中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Es濃度の把握、低減策の開発の取り組みがされると推測する。酵素的間接分析法が市場に流通する食品の品質管理に活用されることを期待する。

略語一覧

3-MCPD;	3-クロロ-1,2-プロパンジオール
2-MCPD;	2-クロロ-1,3-プロパンジオール
3-MBPD;	3-ブロモ-1,2-プロパンジオール
3-MCPD-Es;	3-MCPD脂肪酸エステル類
2-MCPD-Es;	2-MCPD脂肪酸エステル類
G-Es;	グリシドール脂肪酸エステル類
<i>d</i> ₅ ;	重水素標識体
BfR;	ドイツ連邦リスク評価研究所
DGF;	ドイツ脂質科学会
AOCS;	米国油化学会
EFSA;	欧州食品安全機関
TAG;	トリアシルグリセロール
DAG;	ジアシルグリセロール
MAG;	モノアシルグリセロール
GC-MS;	ガスクロマトグラフィー質量分析計
NaBr;	臭化ナトリウム
PBA;	フェニルボロン酸
<i>t</i> BME;	<i>tert</i> -ブチルメチルエーテル
EVOO;	エキストラヴァージンオリーブ油
RSD _r ;	併行精度の相対標準偏差
RSD _R ;	室間再現精度の相対標準偏差
C12;	ラウリン酸
P;	パルミチン酸
O;	オレイン酸
L;	リノール酸
DHA;	ドコサヘキサエン酸
EPA;	エイコサペンタン酸

第1章 緒論

1.1 背景

近年の食や食品に関する事件から、食品の安全への関心は年々高まっている。さらに、科学技術の進歩により、既知物質の健康上の問題が新たに提起されること、これまで検出不可能であったリスク物質が食品中から発見されることも増えてきた。リスク物質に対して、安全保証のための含有実態調査、健康影響評価、生成メカニズムの解明、低減法の確立、等を迅速に行うためには、リスク物質を精度良く定量するための分析法が必要である。分析法の定まっていない新たなリスク物質が発見された際には、分析法の開発が重要度の高い課題であると考ええる。

1970年代、酸加水分解植物性タンパク中に3-クロロ-1,2-プロパンジオール(3-MCPD)等のクロロプロパノール類が含有することが報告された¹⁾。動物試験による3-MCPDの健康影響評価の結果、腎尿細管の過形成が確認された。発がん性については、*in vitro*試験では遺伝毒性を有する可能性が示されているが、生体内で遺伝毒性を有する可能性は示されていない。現在、国際がん研究機関は、3-MCPDをグループ2B「ヒトに対して発がん性があるかもしれない」と分類している²⁾。2001年、EUの食品科学委員会は3-MCPDの耐容一日摂取量を2 µg/kg 体重 (bw) として設定した³⁾。2008年には、CODEX食品汚染物質部会は、製造工程における3-MCPD類低減のための実施規範を採択し、酸加水分解植物性タンパクを含む液体調味料（本醸造しょうゆを除く）における3-MCPDの基準値を最大0.4 mg/kgと設定した⁴⁾。国内においても、食品中の3-MCPD類を工業的に低減するための取り組みを、行政と関連業界が協同で行った。液体の酸加水分解植物性タンパク（アミノ酸液）中の3-MCPDは、植物性タンパクを塩酸共存下で加水分解する工程においてトリアシルグリセロール (TAG) から生じる。3-MCPDの低減対策として、加水分解後の中和・精製工程の前に、3-MCPDを分解する工程としてアルカリ処理の追加を提唱した結果、2011年度のアミノ酸液としょうゆ中の3-MCPD

の含有実態調査結果は、2006年度と比べて大幅に低減したことが報告された⁵⁾。

表1-1. エステル型分析種の分析法

1970年代	酸加水分解植物性タンパクの製造工程において、副産物として3-MCPDが生成することが報告された。
1980年代	3-MCPDに脂肪酸が結合した、3-MCPD-Esの存在が明らかとなった。
2004年	油脂含有食品への3-MCPD-Esの含有が報告された。
	3-MCPD-Esの分析法 ：エステル型3-MCPD-Esを遊離型3-MCPDに酸性条件下のメタノリシスにより分解後、誘導体化して分析した。
2008年	塩化物存在下では、酸性条件下のメタノリシス中に、G-Es由来の3-MCPD-Esが生成するため、3-MCPD-Esが過大評価されることが報告された。
	3-MCPD-Esの分析法 ：アルカリ性条件下のメタノリシスにより、3-MCPD-Esを3-MCPDに分解、誘導体化して分析した
2009年	3-MCPD-Es、G-Esの分析法 ：DGF標準法C-III 18 (09)が報告された。
2010年～	DGF標準法C-III 18 (09)の課題が報告され、各国で分析法開発が進められた。

1980年代には、チェコの研究グループが3-MCPDに脂肪酸が結合した、エステル型の3-MCPD脂肪酸エステル類（3-MCPD-Es）の存在を明らかにした。2004年には、油脂含有食品中に3-MCPD-Esが含有することが報告された⁶⁾。2006年には、油脂含有食品と比べて食用油脂中に比較的高濃度の3-MCPD-Esが検出されたこと、また、油脂や食品中には遊離型3-MCPDよりもエステル型3-MCPD-Esの方が高濃度に含有すること、また、エキストラヴァージンオリーブ油（EVOO）のような未精製油脂中の3-MCPD-Esは未検出もしくは低濃度であるのに対し、精製した油脂では高濃度に含有すること、が報告された⁷⁾。当時3-MCPD-Esの定量には、Divinováらが2004年に提唱した方法が用いられていた⁸⁾。この方法では、複数の類縁化合物が存在するエステル型3-MCPD-Esを、遊離型3-MCPDに酸性条件下で分解（メタノリシス）する手法を用いていた。2008年にはWeiBhaarが3-MCPD-Esをアルカリ性条件下でメタノリシスする方法を開発した⁹⁾。WeiBhaarは、油脂試料中に塩化ナトリウム（NaCl）が存在する場合、酸性条件下のメ

タノリシス中に3-MCPD-Es以外の物質から3-MCPDが生成することから、Divinováらの方法⁸⁾では試料中の3-MCPD濃度は過大評価されることを報告した。その後、この物質の正体はグリシドール脂肪酸エステル類（G-Es）であることが明らかになった¹⁰⁾。国際がん研究機関は遊離型のグリシドール（2,3-エポキシ-1-プロパノール）をグループAとして分類している¹¹⁾。ドイツ脂質科学会（DGF）は3-MCPD-EsとG-Esの分析法として、Weißhaarの方法⁹⁾を基に、DGF標準法C-III 18 (09)¹²⁾を開発し、この方法は当時のドイツの公定法として用いられた。

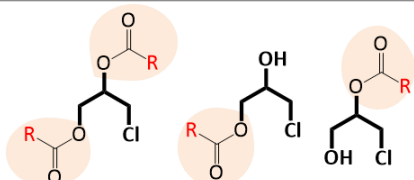
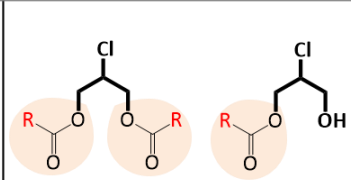
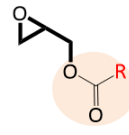
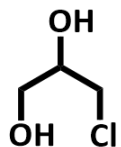
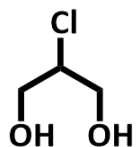
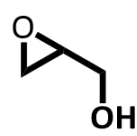
エステル型 分析種	3-MCPD-Es	2-MCPD-Es	G-Es
	 ジエステル モノエステル	 ジエステル モノエステル	
遊離型 分析種	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
			

図1-1. エステル型分析種（3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Es）と遊離型分析種（3-MCPD、2-MCPD、グリシドール）

ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）は、3-MCPD-EsとG-Esは精製した食用油脂に比較的高濃度に含有すること、これらエステル型3-MCPD-Es、G-Esは体内で有毒性の遊離型3-MCPD、グリシドールに分解する可能性を報告した。当初はエステル型自身の毒性はわかっていなかったことから、体内で遊離型の3-MCPD、グリシドールへと完全に分解され、それらが全て体内に吸収されるとの、最悪のケースに基づいた試算により、リスク評価が行われた¹³⁾。精巣鞘膜・腹膜中皮腫が10%増加するベンチマーク用量95%信頼下限値（BMDL₁₀）として、4.06 mg/kg bw/日を用いた時の暴露マージン（MOE）は、食用油脂を原料とする調製粉乳のみを摂取する乳児で670となり、10,000を大きく

下回ることが示された¹⁴⁾。そのため、食用油脂中の3-MCPD-Es、G-Esに対する世間での関心が高まった。2009年には、国内で、高濃度にジアシルグリセロール（DAG）を含む油脂中にG-Esが含まれることが明らかとなった。

これら物質の生成機構については数多く報告されており、油脂の精製、主に脱臭工程にて生成することが分かっている。3-MCPD-Esの生成には塩化物の存在が必要であり、油脂中のTAG、DAG、モノアシルグリセロール（MAG）由来のアシルオキシニウムイオンに塩素が結合することで生成する経路が報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。G-Esは、部分アシルグリセロール（DAG、MAG）を基質とし、主に、DAGの分子内転移、脂肪酸の除去、エポキシ構造の形成によって生じ、生成には塩化物を必要としない。脱臭工程では、G-Esの生成と分解が同時に生じ、220～240℃を超える高熱では生成が優勢となることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。

油脂業界では、食用油脂中の3-MCPD-Es、G-Esを低減するための取り組みが進められている。3-MCPD-Esの低減策として、精製工程前に未精製油を極性溶媒で洗浄することで、基質となる塩化物を除去し、3-MCPD-Esの生成を抑制する方法²²⁾、精製工程後の油脂に*Candida antarctica*由来リパーゼ、ハロヒドリンデハロゲナーゼ酵素、エポキシドヒドラーゼ酵素を作用させ、生成した3-MCPD-Esをグリセロールに変換させる方法²³⁾、等が報告されている。G-Esの低減策として、脱臭工程を低温、長時間にすること、部分アシルグリセロールの少ない油脂を用いることにより、G-Esの生成を抑制する方法、生成したG-Esを活性白土処理により分解する方法²⁴⁾、等が報告されている。

現在はエステル型3-MCPD-Es、G-Es自身の健康影響評価も実施されている。2015年、日本の食品安全委員会は、高濃度にDAGを含む油脂中のG-Esについては、発がんプロモーション作用は否定され、毒性影響は確認されなかったと報告した²⁵⁾。一方で、ヒト体内において食用油脂及び食品中のG-Esが、発がん性を有する遊離型グリシドールに分解される可能性は否定できないことから、ALARA（As Low As Reasonably Achievable）の原則に基づき、合理的に達成可能な範囲でできる限りG-Esの低減に努めべきとの見解を示した。2016年5月、欧州食品安全機関（EFSA）は、食用油脂及び

加工食品についての実態調査から暴露マージン（MOE）を算出した²⁶⁾。その結果、若齢群の高摂取者、特に、調製粉乳のみから栄養を摂取する乳児では、3-MCPD-Es、G-Esは潜在的な健康懸念を引き起こすことが示された。2016年11月、第83回FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、2001年に3-MCPD単独の暫定最大耐容一日摂取量を2 µg/kg bw²⁷⁾と設定していたが、3-MCPD及び3-MCPD-Esのグループ暫定最大耐容一日摂取量として4 µg/kg bw²⁸⁾に改定した。

欧州では、共同研究センターのプロジェクトとして、2013年から2015年にかけて実態調査が行われた²⁶⁾。日本では、農林水産省がリスク管理措置の必要性を検討するための基礎データを得るために、2011～2012年度に食用油脂を中心とした3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査を実施した。国内に流通する食用油脂及び食品中の3-MCPD-Es、G-Esの濃度は、他国の報告と比べて低い傾向であることが報告された^{29, 30)}。

1.2 分析法開発の動き

1.2.1 分析法の課題

2004～2006年にチェコの研究グループは、酸性条件下のメタノリシスによりエステル型3-MCPD-Esを遊離型3-MCPDに分解するDivinováらの方法⁸⁾を用いて、食用油脂と食品中の3-MCPD-Es濃度を報告した。その後、酸性条件かつNaCl存在下では、メタノリシス中にG-Esから3-MCPD-Esへの意図しない変換が生じて、食品中の3-MCPD-Es濃度が過大評価されることが判明した^{9, 10)}。DGFは3-MCPD-EsとG-Esの分析法として、アルカリ性メタノール条件下のメタノリシスにより、エステル型分析種を分解することを特徴としたDGF標準法C-III 18 (09)を開発した¹²⁾。DGF C-III 18 (09)は、1試料につき2つの方法（A法、B法）で分析を行う。A法では3-MCPD-Es及びG-Es由来の3-MCPD総量を算出する。B法では、初めに酸性条件下でG-Esと1-プロパノールを反応させることにより、G-Esを別物質へと変換し、その後、A法と同様の操作を行い、3-MCPD-Es由来の3-MCPDのみを算出する。グリシドール濃度はA法－B法で算出する（図1-2）。

A法↓: 3-MCPD-Es及びG-Es由来の3-MCPD B法↓: 3-MCPD-Es由来の3-MCPD

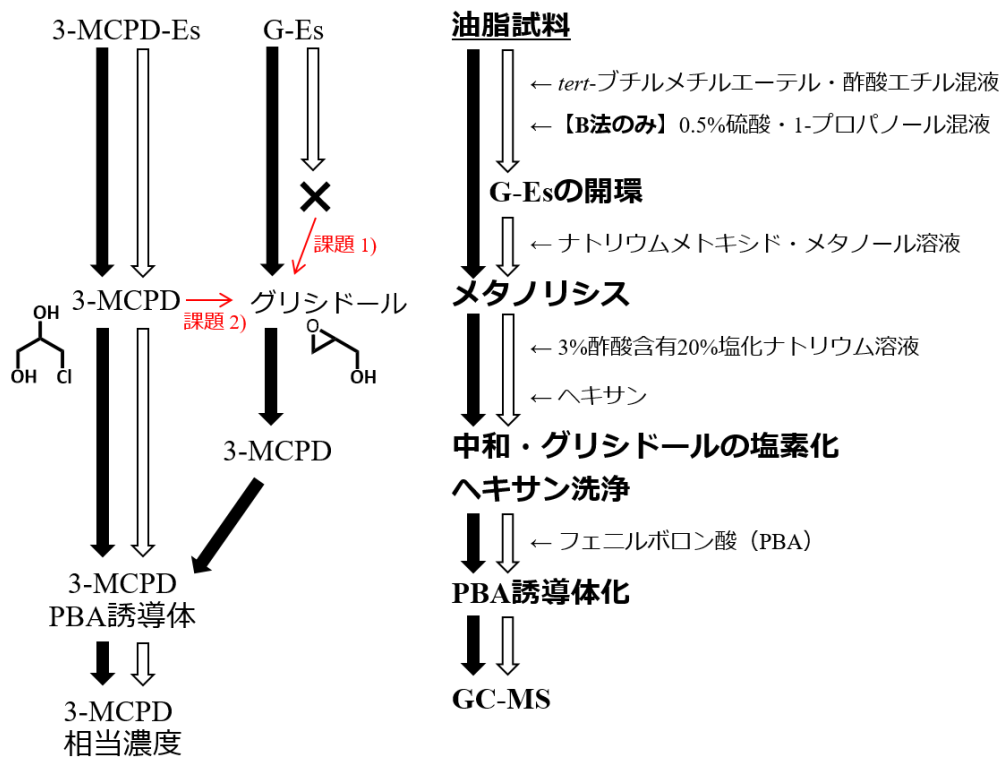


図1-2. DGF標準法 C-III 18 (09)の分析フローと分析法の課題 (→)

2007～2009年にドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) が3-MCPD-Es、G-Esの健康影響評価を公表した当初、DGF標準法C-III 18 (09)が主要な3-MCPD-Es、G-Esの分析法として世界中で用いられてきたが、1) 分析精度に問題があること、2) アルカリ性条件下のメタノリシス中に分析種間の意図しない変換が生じること、3) 分析感度の低さ³¹⁾、等が指摘された。1つ目の分析精度の課題は、G-Esを高濃度に含有する油脂試料では、B法の酸処理により、全てのG-Esを別物質に変換できないことである³²⁾。変換されずに残留したG-Esは3-MCPD-Esとして定量されるため、3-MCPD-Es濃度は過大評価、G-Es濃度は過小評価されてしまう。2つ目の課題は、アルカリ性条件下のメタノリシス中に『3-MCPD-Esや3-MCPD』から『別の物質』への意図しない変換が生じることである³³⁾。後に、アルカリ性条件下では3-MCPDからグリシドールへの変換が進行しやすいことが報告されている³⁴⁾。そのため、2010年以降には各国で、食用油脂を対象とした、精度の高い分析法の開発が進められた。

1.2.2 直接分析法と間接分析法

分析法は、直接分析法と間接分析法の2つに大別される³⁵⁾ (表1-2)。

表1-2. 直接分析法と間接分析法

	直接分析法	間接分析法
対象成分	個々のエステル型分析種	グリセリン骨格に由来する 遊離型分析種
分析操作	固相抽出により、油脂由来の TAG、DAG、MAGを除去	エステル型分析種から 遊離型分析種に分解後、誘導体化
機器	LC-MS、LC-TOFMS、SFC-MS	GC-MS
利点	エステル型分析種の 脂肪酸組成毎に定量可能	簡便、必要な標準試薬が少ない (低コスト)
主な用途	<ul style="list-style-type: none"> ・生成機構の解明 ・有害性の評価 	<ul style="list-style-type: none"> ・スクリーニング ・品質管理

直接分析法は、食用油脂中のTAG、DAG、MAGを2種類の固相カラムによって除去し、エステル型分析種を直接分析する。2-/3-MCPD-EsやG-Esの各エステル型分析種について、結合する脂肪酸の種類、脂肪酸の結合位置・数を区別して定量できるため、分子構造毎に有害性を評価する場合や、生成経路の解明、低減策の効果を検証する場合に有効な手段である。3-MCPD-Esの直接分析法は、液体クロマトグラフィー飛行時間質量分析計(LC-TOFMS)³⁶⁾、LC-MS/MS³⁷⁾や超臨界クロマトグラフィー(SFC)-MS³⁸⁾を用いた方法が報告されている。3-MCPD-Esはモノエステル及びジエステルが存在するため、定量には数十種類もの標準試薬を要する。G-Esの直接分析法は、日本油化学会(JOCS)及び米国油化学会(AOCS)による合同試験後、2013年に日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法2.4.13-2013³⁹⁾及びJoint AOCS/JOCS Official Method Cd28-10⁴⁰⁾として登録された。G-Esはモノエステルのみであるため、食用油脂の主要な脂肪酸であるパルミチン酸(P)、ステアリン酸(S)、オレイン酸(O)、リノール酸(L)、

リノレン酸 (Ln) が結合した5種類のG-Es標準試薬を用いて定量する。

間接分析法は、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esのエステル型分析種を遊離型分析種に分解後、誘導体化してガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) にて分析する。脂肪酸の種類、脂肪酸の結合位置にかかわらず、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの遊離型相当濃度を同時に定量できるため、必要な標準試薬の種類も少なく、簡便である。そのため、間接分析法はスクリーニング分析や品質保証に有効な手段である。

1.2.3 食用油脂を対象とした間接分析法

間接分析法のエステル型分析種の分解手法は提案者によって異なり、主に、酸性またはアルカリ性条件下のメタノリシスが用いられる。過去、塩化物の存在下かつ酸性条件下のメタノリシス中にG-Esから3-MCPD-Esまたは3-MCPDへ、アルカリ性条件下のメタノリシス中に3-MCPD-EsからG-Esまたはグリシドールへの意図しない変換が生じることが報告された。そのため、エステル型分析種から遊離型分析種への分解中の、分析種間の意図しない変換を防ぐことが間接分析法を開発する際の共通課題であった。各分析法の分解の手法を下記に述べる。

ErmacoraとHrncirikの開発した方法は、油脂試料中のG-Esのエポキシ構造を臭化ナトリウム (NaBr) によって開環 (臭素化) し、3-ブromo-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル類 (3-MBPD-Es) へ変換する。次いで、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、3-MBPD-Esを有機溶媒で抽出し、希硫酸・メタノール溶液中で16時間かけてメタノリシスを行う手法である⁴¹⁾。

Kuhlmannの開発した方法は、油脂試料に低濃度のナトリウムメトキシドを加え、アルカリ性かつ低温 (-22~-28℃) 条件下でメタノリシスを行うことにより、3-MCPD-EsからG-Esまたはグリシドールへの意図しない変換を抑制する。分析法とは別に、メタノリシス中の3-MCPD-EsからG-Esへの意図しない変換の割合を係数で補正する。この係数を求めるために、別途、検液調製が必要である⁴²⁾。

DGFは、DGF C-III 18 (09)¹²⁾の改良法としてDGF C-IV 18 (10)⁴³⁾を開発した。1つの油

脂試料を2本の試験管に採取し、2つの方法（A法とB法）で分析する。A法、B法ともに高濃度のナトリウムメトキシドを加えて、アルカリ性条件下で3.5～5.5分間メタノリシスを行う。A法の試験管には酸性のNaCl溶液、B法の試験管には酸性のNaBr溶液を加えて、中和及びグリシドールを塩素化（A法）または臭素化（B法）する。A法では3-MCPD-EsとG-Es由来の3-MCPD濃度、B法では3-MCPD-Es由来の3-MCPD濃度を得る。B法のグリシドールの臭素化によって得られた3-MBPDは分析対象外であるため、グリシドール濃度 = (A法の3-MCPD濃度) - (B法の3-MCPD濃度) × 変換係数で算出する。3-MCPD-EsからG-Esへの変換係数を算出するには、別途、検液調製が必要である。なお、DGF C-IV 18 (10)では、2-MCPD-Esは分析対象外である。

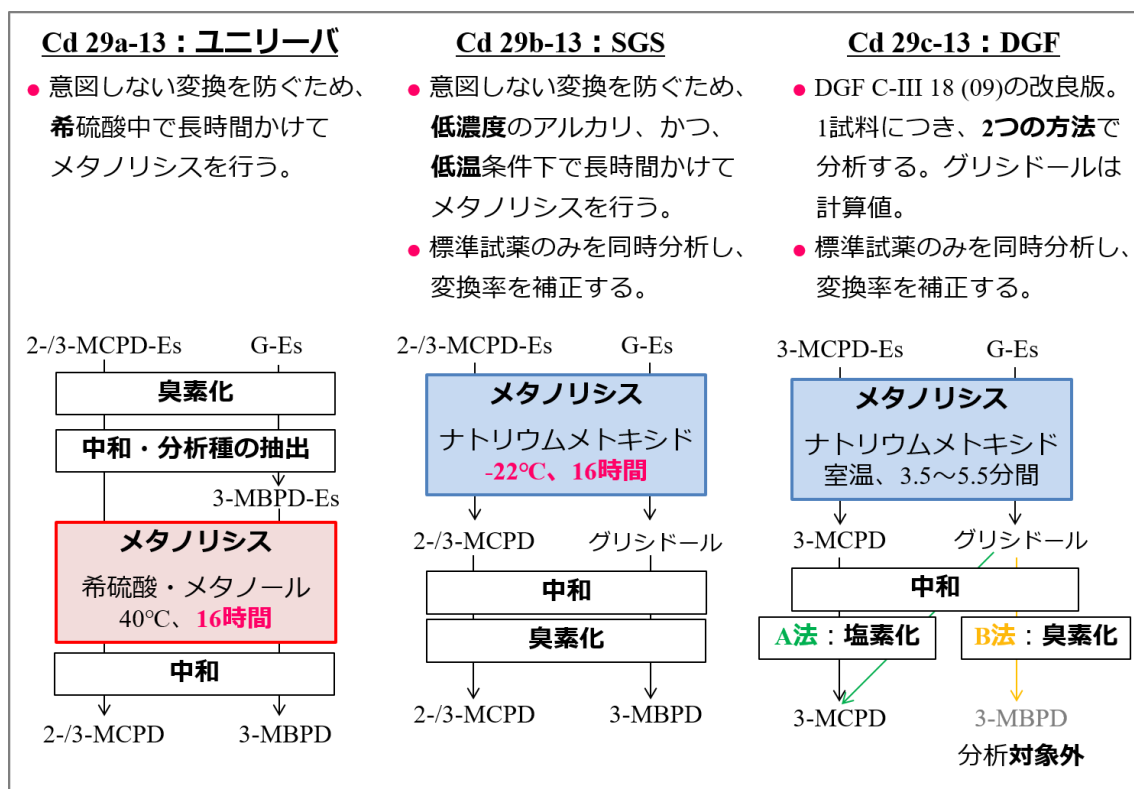


図1-3. AOCS Official Method 3法の概略図

これら3法は、AOCSによる合同試験後、AOCS Official Method Cd29a⁴⁴⁾、Cd29b⁴⁵⁾、Cd29c⁴⁶⁾として登録された（図1-3）。Cd29a、29bは分析種間の意図しない変換を防ぐために弱酸性、または弱アルカリ性かつ低温で反応するため、メタノリシスに長時間

を要する。Cd29cは、メタノリシスに要する時間は短いですが、1つの試料につき2つの方法で分析する必要がある。また、3法とも、内標準補正にエステル型分析種の重水素標識物を用いる。検量線作成用の標準試料もメタノリシスが必要であるため、検量線溶液の調製は、油脂試料と同様の操作が必要である。

1-3 本研究の目的

食用油脂中の3-MCPD-Es、G-Esの存在が明らかとなった2009年頃には、間接分析法としてDGF C-III 18 (09)¹²⁾が主に用いられていたが、前述のとおり、意図しない変換が生じることや分析精度等に問題があることが指摘された（図1-2）。本研究では、食用油脂及び油脂含有食品の安全性を保証するために、精度良く、幅広い試料に適用できる新たな間接分析法の開発を目的として、下記の研究を行った。

第2章 食用油脂を対象とした酵素的間接分析法の開発

エステル型分析種から遊離型分析種への分解手法として、中性付近のpHにおいて穏やかに作用するリパーゼに着目した。エステル型分析種に対して分解特異性の高いリパーゼ及び加水分解条件を選定することで、食用油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの同時かつ迅速な間接分析法の開発を試みた。

第3章 合同試験

開発した酵素的間接分析法を、市場に流通する食品の品質保証や、含有実態調査に活用してもらうため、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録を目指した。登録の必要条件の1つである、実用に供しうる空間再現精度を有することを確認するため、全13機関にて合同試験を実施した。合同試験に適した油脂試料を選定・調製し、配布した。各機関の分析値を解析し、併行精度の相対標準偏差（ RSD_r ）、空間再現精度の相対標準偏差（ RSD_R ）、Horwitz ratiosを用いた評価により、分析法の性能を考察した。

第4章 魚油を対象とした酵素的分析法の改良

酵素的間接分析法の加水分解に用いる *Candida rugosa*（または、*C. cylindracea*）由来リパーゼは、エイコサペンタン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）に対する分解特異性が低いため、基準油脂分析試験法 基準法2.4.14-2016の適用範囲は、植物油脂、動物油脂（魚油を除く）としている。魚油に適した分析法を確立するため、DHAが結合した3-MCPD、グリシドールの分解に適したリパーゼの種類及び加水分解条件を選定し、酵素的間接分析法の改良を試みた。

第5章 酵素的間接分析法の油脂含有食品への適用

油脂を原料とする食品の製造工程や家庭調理による3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの動態、また、食品中の含有濃度を把握するためには、食用油脂に加えて油脂含有食品を対象とした分析法が必要である。酵素的間接分析法の適用範囲を、食用油脂から油脂含有食品にまで拡大するため、酵素的間接分析法を用いて分析できる食品群を明確にした。適用範囲外の食品群に対しては、油脂以外の食品成分を除去する前処理を追加することにより、適用を試みた。

第2章 酵素的間接分析法の開発

2.1 序論

食用油脂に3-MCPD-Es、G-Esの含有が明らかになった当初は、間接分析法としてDGF標準法 C-III 18 (09)が主に用いられていたが、アルカリ性条件下でのメタノリシス中に3-MCPD-Esからグリシドールへの意図しない変換が生じることや分析精度に問題があることが指摘された。過去には、酸性条件かつ塩化物の存在下でのメタノリシス中にG-Esから3-MCPDへの意図しない変換が生じることとも報告された。

筆者は、食用油脂の安全性を保証するために、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの同時間接分析法の開発に着手した⁴⁷⁾。分析種間の意図しない変換を防ぎ、かつ、迅速に加水分解できる手法として2つの理由からリパーゼに着目した。1つ目は穏やかな条件で加水分解を進行できることである。多くのリパーゼの最適pHは中性付近にあり、極端な酸性、アルカリ性pHにせずとも加水分解を行うことができる。そのため、pH変化による意図しない変換を抑制できると考えた。2つ目はエステル型分析種の分解の迅速化である。リパーゼはその由来によって、脂肪酸の種類と結合位置、アシルグリセロール、等に対して分解特異性を有する。3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esに対する分解特異性が高いリパーゼ及び適した加水分解条件を選定することで、迅速に加水分解を完了できると考えた。

本章では、エステル型分析種の加水分解手法として、リパーゼを用いることを特徴とした、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの同時、かつ、迅速な間接分析法の開発を目的とした。

2.2 方法

2.2.1 油脂試料

なたね油、ひまわり油、オリーブ油、エキストラヴァージンオリーブ油 (EVOO)、大豆油、コーン油、米ぬか油、ごま油、紅花油、グレープシードオイル、パーム液体油、パーム固体脂 3種、パームステアリン、極度硬化大豆油、豚脂 2種、牛脂は市販品を用いた。各パーム油と極度硬化大豆油の上昇融点は、パーム液体油 10℃、パーム固体脂 3種 46℃、47℃、50℃、パームステアリン 53℃、極度硬化大豆油 69℃であった。

2.2.2 試薬

遊離型分析種の標準試薬として、3-MCPD、3-MBPDは和光純薬工業製(大阪、日本)、3-MBPD-*d*₅はCDN Isotope製(ケベック、カナダ)、2-MCPD、2-MCPD-*d*₅、3-MBPD-*d*₅はToronto Research Chemicals製(オンタリオ、カナダ)を用いた(表2-1)。

表2-1. 酵素的間接分析法の検量線作製に使用する遊離型分析種の標準試薬

分析種	組成式	分子量
3-MCPD	C ₃ H ₇ ClO ₂	110.54
3-MCPD- <i>d</i> ₅	C ₃ H ₂ D ₅ ClO ₂	115.57
2-MCPD	C ₃ H ₇ ClO ₂	110.54
2-MCPD- <i>d</i> ₅	C ₃ H ₂ D ₅ ClO ₂	115.57
3-MBPD	C ₃ H ₇ BrO ₂	154.99
3-MBPD- <i>d</i> ₅	C ₃ H ₂ D ₅ BrO ₂	160.02

エステル型分析種の標準試薬として、3-MCPDジラウリレート(3-MCPD-C12/C12)、3-MCPDジパルミテート(3-MCPD-P/P)、3-MCPD 1-パルミテート(3-MCPD-1-P)、3-MCPDジオレエート(3-MCPD-O/O)、3-MCPD 1-オレエート(3-MCPD-1-O)、3-MCPD ジリノレート(3-MCPD-L/L)、3-MCPD-O/O-*d*₅、グリシジルパルミテート(G-P)、

グリシジルオレエート (G-O) 、グリシジルリノレート (G-L) は和光純薬工業製、G-O-*d*₅、2-MCPDジパルミテート (2-MCPD-P/P) 、2-MCPDジリノレート (2-MCPD-L/L) 、2-MCPD-L/L-*d*₅はToronto Research Chemicals製を用いた (表2-2) 。

表2-2. 添加回収実験用のエステル型分析種の標準試薬

分析種	分子式	分子量
3-MCPD-C12/C12	C ₂₇ H ₅₁ ClO ₄	475.14
3-MCPD-P/P	C ₃₅ H ₆₇ ClO ₄	587.36
3-MCPD-O/O	C ₃₉ H ₇₁ ClO ₄	639.43
3-MCPD-L/L	C ₃₉ H ₆₇ ClO ₄	635.40
3-MCPD-1-P	C ₁₉ H ₃₇ ClO ₃	348.95
3-MCPD-1-O	C ₂₁ H ₃₉ ClO ₃	374.99
3-MCPD-O/O- <i>d</i> ₅	C ₃₉ H ₆₆ D ₅ ClO ₄	644.46
2-MCPD-P/P	C ₃₅ H ₆₇ ClO ₄	587.36
2-MCPD-L/L	C ₃₉ H ₆₇ ClO ₄	635.40
2-MCPD-L/L- <i>d</i> ₅	C ₃₉ H ₆₂ D ₅ ClO ₄	640.43
G-P	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	312.49
G-O	C ₂₁ H ₃₈ O ₃	338.52
G-L	C ₂₁ H ₃₆ O ₃	336.51
G-O- <i>d</i> ₅	C ₂₁ H ₃₃ D ₅ O ₃	343.56

フェニルボロン酸 (PBA) は東京化成工業製 (東京、日本) 、リパーゼAYアマノ30G は天野エンザイム製 (愛知、日本) 、リパーゼAYSアマノ、リパーゼASアマノ、リパーゼGアマノ50、リパーゼF-APは和光純薬工業製、Lipase from *Candida rugosa*、Lipase from *Candida antarctica*はSIGMA-Aldrich製 (ミズーリ、アメリカ) 、リパーゼOF、リパーゼMYは名糖産業製 (東京、日本) を用いた。なお現在、リパーゼOFとリパーゼMYは、食品分析用試薬のリパーゼH, from *Candida cylindracea*、リパーゼS, from *Candida cylindracea*として和光純薬工業から販売されている。酵素の1ユニット (U) は、日本

薬局方の一般試験法である脂肪消化力試験法⁴⁸⁾を用いて37℃、pH 7.0の条件下で試験した際に、1分間に1 μmolの脂肪酸の増加をもたらす酵素量として定義した。

臭化ナトリウム（特級）、リン酸水素二ナトリウム（特級）、アセトン（特級）、エタノール（特級）、イソオクタン（2,2,4-トリメチルペンタン）（特級）、ヘキサン（特級）、酢酸エチル（特級）、1-ブタノール（特級）、メタノール（特級）、*n*-ヘプタン（特級）、トルエン（特級）、*tert*-ブチルメチルエーテル（残留農薬試験用）、テトラヒドロフラン（特級）、炭酸水素ナトリウム、硫酸ナトリウムは和光純薬工業製、クエン酸またはクエン酸一水和物、硫酸（特級）は関東化学製を用いた。

2.2.3 試薬の調製

調製試薬1. 30% (w/v) 臭化ナトリウム (NaBr) 水溶液：100 mL調製する場合は、NaBr 30 gを超純水80 mLに溶解した。次いで、1 mMクエン酸水溶液、1 mMリン酸水素二ナトリウム水溶液の双方を加えてpHを5.0～5.5に調整後、超純水を加えて100 mLとした。蓋付ガラス製容器に入れ、室温で保存した。

調製試薬2. 90 U/mLリパーゼ含有NaBr水溶液：油脂試料10を分析する場合、*Candida rugosa*または*Candida cylindracea*由来リパーゼを3,600 Uとなるように30%NaBr水溶液〔調製試薬1〕40 mLに加えた。マグネチックスタラーを用いて、穏やかに攪拌して溶解した。

※短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合は、*Candida rugosa*または*Candida cylindracea*由来リパーゼを7,200 Uとなるように30%NaBr水溶液〔調製試薬1〕40 mLに溶解した。短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂を含まない試料でも、180 U/mLリパーゼ含有NaBr水溶液を用いても問題ない。

調製試薬3. PBA溶液：PBA 0.25 gを超純水／アセトン（1:19, vol）混液10 mLに溶解し、調製した。蓋付ガラス製容器に入れ、冷蔵庫で保存した。

300 µg/mL遊離型標準ストック溶液：3-MCPD、2-MCPD、3-MBPDの各標準試薬を3.0 mgとなるように10 mL容メスフラスコに秤量し、エタノールで定容した。各ストック溶液は分析種間の変換を防止するため、混合せずに分析種毎に調製した。クrimpキャップ付バイアルに小分け、密封して、冷凍で保存した。

200 µg/mL内標準ストック溶液：3-MCPD-*d*₅、2-MCPD-*d*₅、3-MBPD-*d*₅の各標準試薬を1.0 mgとなるように5 mL容メスフラスコに秤量し、エタノールで定容した。各ストック溶液は分析種間の変換を防止するため、混合せずに分析種毎に調製した。クrimpキャップ付バイアルに小分け、密封して、冷凍で保存した。

検量線作成用の混合標準溶液

検量線混合溶液と内標準混合溶液は混合溶液であるため、分析種間の変換を防止するため、分析日に用時調製した。

15 µg/mL検量線混合溶液 I： 3-MCPD、2-MCPD、3-MBPDの各ストック溶液0.5 mLを10 mL容メスフラスコに加え、30%NaBr水溶液 [調製試薬1] で定容した。

1.5 µg/mL検量線混合溶液 II： 検量線混合溶液I 1mLを10 mL容メスフラスコに加え、30%NaBr水溶液 [調製試薬1] で定容した。

2.0 µg/mL内標準混合溶液： 3-MCPD-*d*₅、2-MCPD-*d*₅、3-MBPD-*d*₅のストック溶液を0.1 mLずつ10 mL容メスフラスコに加え、30%NaBr水溶液 [調製試薬1] で定容した。

添加回収実験用のエステル型分析種の1000 µg/mLストック溶液：各エステル型分析種の標準試薬を10 mgとなるように10 mL容メスフラスコに秤量し、トルエンで定容した。クリンブキャップ付バイアルに入れ、冷凍で保存した。

内標準検討用のエステル型分析種の内標準試薬の1000 µg/mLストック溶液：各エステル型内標準試薬を10 mgとなるように10 mL容メスフラスコに秤量し、トルエンで定容した。クリンブキャップ付バイアルに入れ、冷凍で保存した。

2.2.4 同時間接分析法の原案

分析法開発時に原案とした方法を下記に示す。

油脂試料100～110 mgを10 mL容スクリュウキャップ付ガラス試験管に採取した。油脂試料を溶解するための溶媒を添加する場合は、ここで溶媒を加えてボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。リパーゼを溶解した30% NaBr水溶液 3 mLを加えて蓋を閉め、室温（25℃）、30分間、高速振とう機を用いて振とうした。その後、試験管に2.0 µg/mL内標準混合溶液を50 µL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。試験管にヘキサンを3 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、遠心分離機で3,000 rpm、10秒間遠心分離した。有機層をパスツールピペットで除去し、再度ヘキサンを3 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。有機層をパスツールピペットで除去した。10% (w/v) PBA含有超純水／アセトン（1:19, vol）混液を20 µL加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。試験管を85℃に調節した恒温水槽で10分間加温した。その後、試験管を室温になるまで放冷、または水冷した。抽出溶媒を3 mL加え、5～10分間振とうした。有機層を0.45 µmメンブレンフィルターでろ過し、GC-MS検液とした。

2.2.5 酵素的間接分析法

酵素的間接分析法のフローを示す（図2-1）。

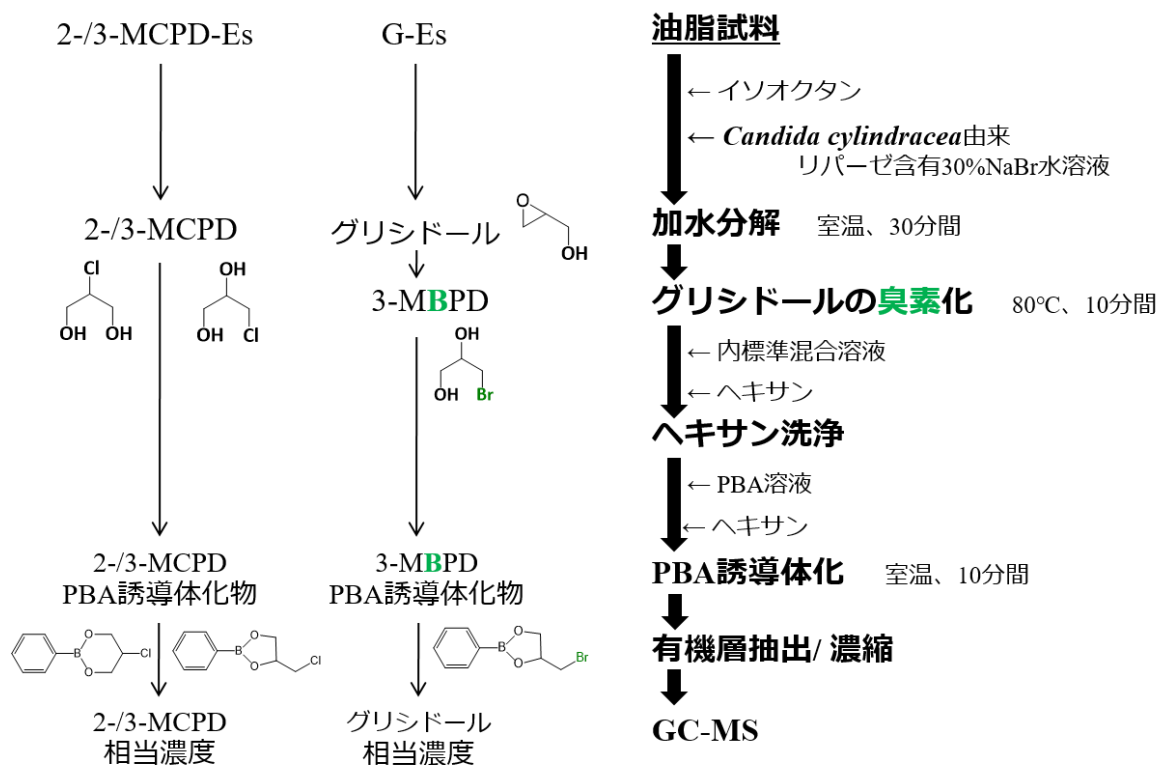


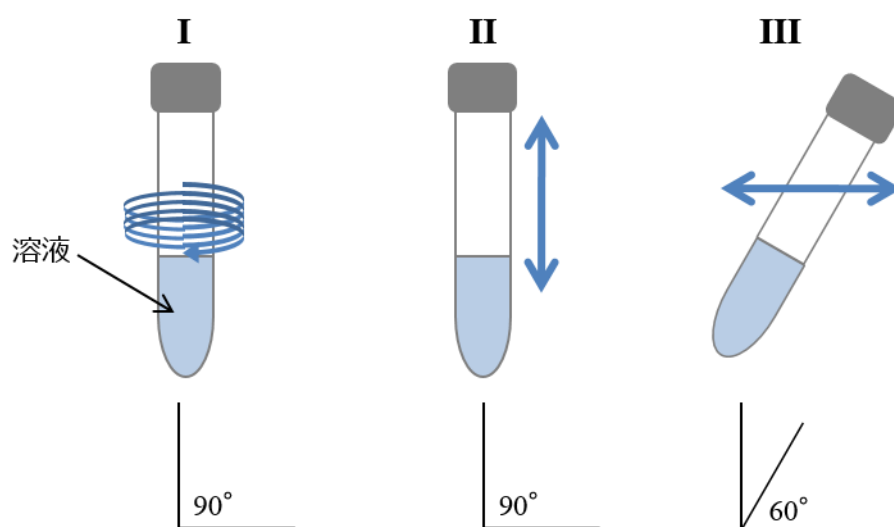
図2-1. 酵素的間接分析法のフロー

加水分解、グリシドールの臭素化

油脂試料100～110 mgを10 mL容スクリーキャップ付ガラス試験管に採取した。イソオクタン0.2 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌して油脂試料を溶解した。室温で固体の油脂試料は、イソオクタン0.5 mLを加え、60°Cに調節した恒温水槽で加温し、溶解した。なお、上昇融点が60°C以上の油脂試料の場合は80°Cで加温した。90 U/mL *Candida rugosa* (または、*C. cylindracea*) 由来リパーゼ含有30%NaBr水溶液 (pH 5) [調製試薬2] を3 mL加えた。

※乳脂、やし油等の短・中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合は、180 U/mL リパーゼ含有30%NaBr水溶液を用いること [第4章参照]。長鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合でも、180 U/mLリパーゼ含有30%NaBr水溶液を用いてもよい。

蓋を閉め、高速振とう機を用いて室温（25℃）、30分間振とうした（図2-2）。振とう機は、水平偏芯振動振とう機では、試験管を鉛直に置き、速度1,800 rpmとした。縦往復振とう機では、試験管を鉛直に置き、速度200 rpm、振幅4 cmとした。水平往復振とう機では、試験管を水平から60°の傾きに置き、速度250～400 rpm、振幅2～3 cmとした。この操作で、分析種をエステル型から遊離型に分解した。



試験管の方向	鉛直	鉛直	水平に対して60°
振とう方式	水平偏芯震動	縦往復	水平往復
速度 (rpm)	1,800	200	250～400

図2-2. 加水分解時の各振とう方式と振とう速度

遠心分離機で3,000 rpm、10秒間遠心分離し、試験管を80℃に調節した恒温水層で10分間加温し、グリシドールを臭素化して3-MBPDへと変換した。その後、試験管を室温になるまで放冷、または水冷した。

内標準添加、ヘキサン洗浄

試験管に2.0 μg/mL内標準混合溶液を50 μL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。試験管にヘキサンを3 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、遠心分離機で3,000 rpm、10秒間遠心分離した。親水性の遊離型分析種は水層（下層）に移

行するため、パスツールピペットで水層を新たな試験管に移した。水層を移した試験管にヘキサンを3 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。油脂や脂肪酸、リパーゼ残渣等の夾雑成分を有機層（上層）とともに除去した。

※やし油等の中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合は、ヘキサン洗浄前に、ジエチルエーテル3 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌・遠心分離後、ジエチルエーテル層を除去した。その後、ヘキサン洗浄を2回行った。この操作により、水層に一部溶解した中鎖脂肪酸を除去した。

PBA誘導体化、抽出

試験管内の水層に、PBA溶液〔調製試薬3〕を0.1 mL、ヘキサンを3 mL加えて蓋を閉めた。試験管を振とう機で10分間振とうし、遊離型分析種と重水素標識された遊離型分析種を誘導体化した。有機層の下部にゲルや気泡が生じた場合は、試験管をさらにボルテックスミキサーで攪拌、遠心分離機で3,000～3,500 rpm、1～5分間遠心分離した。新たな試験管に脱水用の硫酸ナトリウムを採取した。新たな試験管に、疎水性のPBA誘導体化物を含む有機層をパスツールピペットで移した。次いで、新たな試験管中の有機層を、40℃以下の加温下で、窒素ガスを吹き付け、0.3～0.8 mLに濃縮した。PBA誘導体化物の揮散を防ぐため、ヘキサンを完全に留去させないように注意した。完全に留去した場合は、ヘキサン 0.3～0.5 mLを加えた。試験管をボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、溶液を0.2 μmメンブレンフィルターでろ過し、GC-MS検液とした。

2.2.6 検量線溶液の調製

1.5 μg/mL検量線混合溶液 IIを各試験管に、5、20、50、100 μLずつ加えた。15 μg/mL検量線混合溶液 Iを各試験管に、20、35、50、80 μLずつ加えた。検量線混合溶液を加えた試験管8本と、無添加の試験管1本に、2.0 μg/mL内標準混合溶液を50 μL加えた。さらに、30%NaBr水溶液〔調製試薬1〕を3 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。前述した〔2.2.5のPBA誘導体化、抽出〕に従い、GC-MS検液とした。

2.2.7 GC-MS

GC-MSは、Thermo Fisher Scientific製（マサチューセッツ、アメリカ）のTSQ Quantum GCとTRACE GC Ultraを連結した装置を使用した。GCとMSの条件を下記に示す。

ガスクロマトグラフ（GC）

カラム：VF-5ms（Agilent Technologies製（カリフォルニア、アメリカ））

長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、ガードカラム 5 m

キャリアーガス：ヘリウムガス、1.2 mL/分 一定流量

注入量：1.5 μ L、スプリットレス

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

カラムオープン：60 $^{\circ}$ C（1分保持）, 60~150 $^{\circ}$ C（10 $^{\circ}$ C/分）, 150~180 $^{\circ}$ C（3 $^{\circ}$ C/分）, 180~300 $^{\circ}$ C（30 $^{\circ}$ C/分）, 300 $^{\circ}$ C（8分保持） 計32分間

質量分析計（MS）

イオン化法：電子イオン化、正イオンモード

GC-MS接続部温度：280 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

選択イオン：各標準物質の定量イオン、定性イオンを下記に示す。

3-MCPD- d_5 PBA誘導体： m/z 150, 201

3-MCPD PBA誘導体： m/z 147, 196

2-MCPD- d_5 PBA誘導体： m/z 201, 203

2-MCPD PBA誘導体： m/z 196, 198

3-MBPD- d_5 PBA誘導体： m/z 150, 245

3-MBPD PBA誘導体： m/z 147, 240

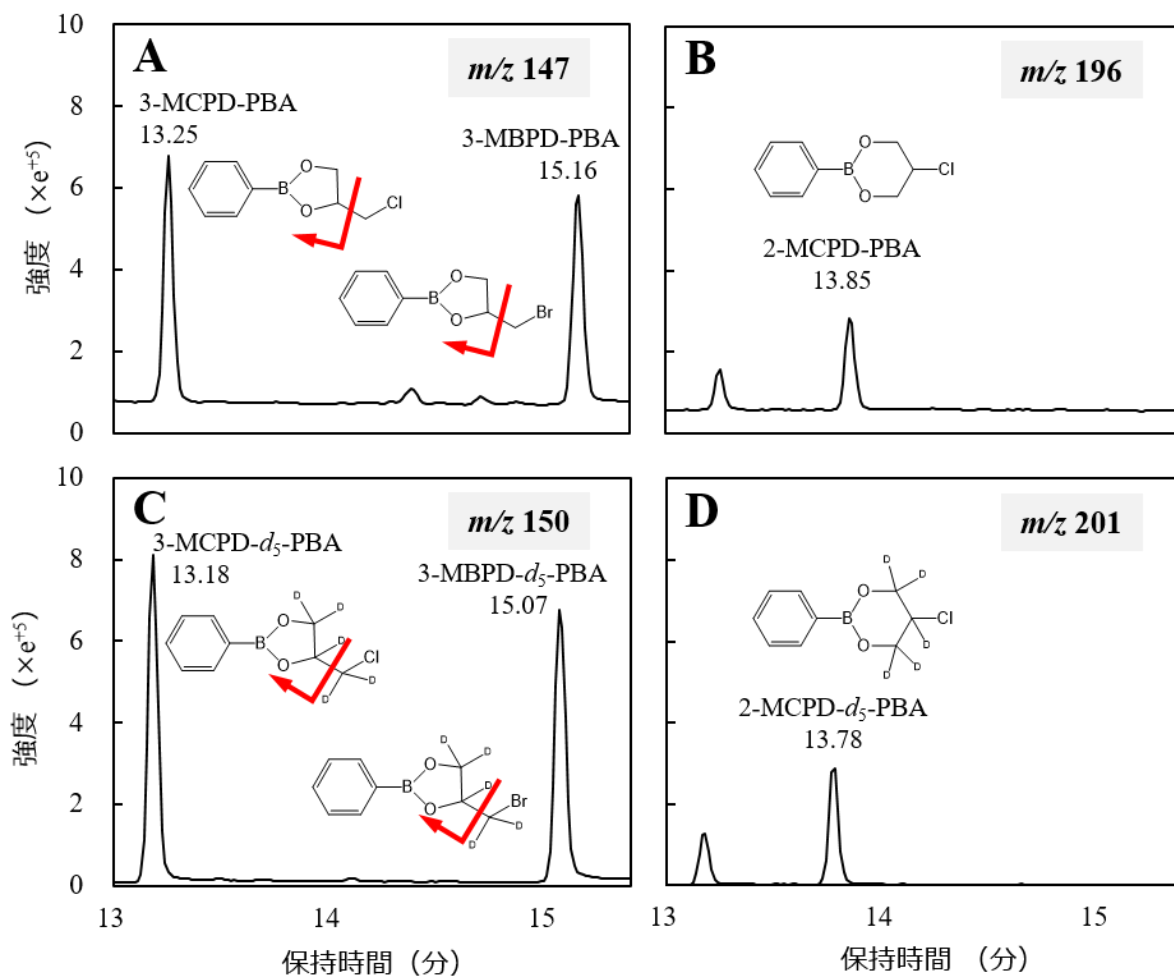


図2-3. 各PBA誘導体化物のGC-MSクロマトグラム。

A : 3-MCPD-PBAと3-MBPD-PBA (m/z 147) 、 B : 2-MCPD-PBA (m/z 196)

C : 3-MCPD- d_5 -PBAと3-MBPD- d_5 -PBA (m/z 150) 、 D : 2-MCPD- d_5 -PBA (m/z 201)

2.2.8 定量

検量線溶液について、内標準PBA誘導体のピーク面積に対する標準PBA誘導体のピーク面積の比をY軸に、内標準PBA誘導体の量に対する標準PBA誘導体の量の比をX軸にプロットして分析種毎の内標準検量線である $Y = aX + b$ を得た。ここでは、 a は傾き、 b は切片である。試料のGC-MS検液について、内標準検量線から各遊離型相当濃度を算出した。

3-MCPD遊離型相当濃度は、下式を用いて算出した。

$$C = [(A_{147}/A_{150}) - b] \times IS \times 1/a \times 1/W$$

ただし、

- C : 試料中の3-MCPD遊離型相当濃度 (mg/kg)
- A₁₄₇ : 3-MCPD PBA誘導体 (m/z 147) のピーク面積
- A₁₅₀ : 3-MCPD-d₅ PBA誘導体 (m/z 150) のピーク面積
- IS : 添加した3-MCPD-d₅の含量 (μg)
- W : 採取した試料の重量 (g)

2-MCPD遊離型相当濃度は、下式を用いて算出した。なお、2-MCPD-d₅試薬は他の内標準試薬と比べて入手しづらい。そのため、2-MCPD-d₅の代わりに3-MCPD-d₅を用いた方法で2-MCPDの定量を行っても良い^{34, 49)}。

$$C = [(A_{196}/A_{201}) - b] \times IS \times 1/a \times 1/W$$

ただし、

- C : 試料中の2-MCPD遊離型相当濃度 (mg/kg)
- A₁₉₆ : 2-MCPD PBA誘導体 (m/z 196) のピーク面積
- A₂₀₁ : 2-MCPD-d₅ PBA誘導体 (m/z 201) のピーク面積
- IS : 添加した2-MCPD-d₅の含量 (μg)
- W : 採取した試料の重量 (g)

グリシドール遊離型相当濃度は、他の分析種と同様に、3-MBPD-d₅ PBA誘導体に対する3-MBPD PBA誘導体の検量線を得て、下式を用いて試料中の3-MBPD遊離型相当濃度を算出した。

$$C = [(A_{147}/A_{150}) - b] \times IS \times 1/a \times 1/W$$

ただし、

- C : 試料中の3-MBPD遊離型相当濃度 (mg/kg)
- A_{147} : 3-MBPD PBA誘導体 (m/z 147) のピーク面積
- A_{150} : 3-MBPD- d_5 PBA誘導体 (m/z 150) のピーク面積
- IS : 添加した3-MBPD- d_5 の含量 (μg)
- W : 採取した試料の重量 (g)

次いで、下式を用いて3-MBPD遊離型相当濃度をグリシドール遊離型相当濃度に換算した。

$$C_{\text{Glycidol}} = C_{3\text{-MBPD}} \times (M_{\text{Glycidol}} / M_{3\text{-MBPD}})$$

ただし、

- C_{Glycidol} : 試料中のグリシドール遊離型相当濃度 (mg/kg)
- $C_{3\text{-MBPD}}$: 試料中の3-MBPD遊離型相当濃度 (mg/kg)
- M_{Glycidol} : グリシドールの分子量 74.08
- $M_{3\text{-MBPD}}$: 3-MBPDの分子量 154.99

2.2.9 添加回収実験

10 mL容スクリーキャップ付ガラス試験管に、ガラス製マイクロシリンジでエステル型分析種のストック溶液 (溶媒: トルエン) を加え、窒素ガスを吹き付けてトルエンを留去した。次いで、油脂試料を100~110 mg採取し、ボルテックスミキサーで攪拌して添加回収実験用の試料とした。添加回収率は、下式を用いて算出した。

$$\text{回収率 (\%)} = (C_{\text{spiked}} - C_{\text{blank}}) / C_{\text{free}} \times 100$$

ただし、

- C_{spiked} : エステル型分析種標準を添加した遊離型相当濃度の測定値 (mg/kg)
- C_{blank} : 標準無添加の遊離型相当濃度の測定値 (mg/kg)
- C_{free} : 添加したエステル型分析種の遊離型相当濃度の計算値 (mg/kg)

下式を用いて、試料に添加したエステル型相当濃度を遊離型相当濃度に換算した。

$$C_{\text{free}} = C_{\text{ester}} \times (M_{\text{free}}/M_{\text{ester}})$$

ただし、

C_{ester} : 試料に添加したエステル型相当濃度 (mg/kg)

M_{free} : 遊離型分析種の分子量

M_{ester} : 添加したエステル型分析種の分子量

Codex Alimentarius Commission Procedural Manual⁵⁰⁾において、添加濃度が100 µg/kg～10 mg/kgの場合、回収率の許容範囲は80～110%と定義されているため、本研究でも80～110%を良好な回収率とした。本分析法では、加水分解・グリシドールの臭素化工程以降の操作は各遊離型分析種の重水素標識内標準を用いて補正している。そのため、回収率は加水分解率とグリシドールの臭素化効率を反映しているものとして各実験を行った。

2.2.10 AOCS Official Method Cd29a

他法との分析値の比較では、下記に示すAOCS Cd29aを用いた。

G-Es臭素化、中和

油脂試料 100 mgを10 mL容スクリーキャップ付ガラス試験管に採取した。試験管にエステル型分析種の内標準混合溶液 (40 µg/mL 3-MCPD-O/O- d_5 トルエン溶液及び、50 µg/mL G-O- d_5 トルエン溶液) を50 µL、テトラヒドロフラン (無水) を2 mL加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌して油脂試料を溶解した。試験管に、酸性のNaBr溶液 (3 mg/mL NaBr水溶液、5% (v/v) 硫酸) を30 µL加え、50°C、15分間加温して、G-Esを3-MBPD-Esへと臭素化した。次いで、臭素化反応を停止するために、試験管に0.6% (w/v) 炭酸水素ナトリウム水溶液を3 mL加えた。

有機層抽出、メタノリシス

試験管に*n*-ヘプタンを2 mL加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌後、有機層をパスツールピペットで新たな試験管に移した。試験管中の有機層を、40℃以下の加温下で、窒素ガスを吹き付けて留去した。残渣にテトラヒドロフランを1 mL加えて溶解し、1.8% (v/v) 硫酸・メタノール溶液を1.8 mL加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌した。エステル型分析種を遊離型分析種へ分解するため、40℃、16時間加温した。

中和、溶媒留去

16時間経過後、反応を止めるために飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を0.5 mL加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。メタノールを除去するため、液量が約1 mLになるまで窒素ガスを吹き付けた。20% (w/v) 硫酸ナトリウム水溶液を2 mL、*n*-ヘプタンを2 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。

ヘキサン洗浄、PBA誘導体化、溶媒留去

パスツールピペットで有機層を除去し、再度、*n*-ヘプタンを2 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。有機層を除去し、飽和PBA・超純水/アセトン (1:19, vol) 混液を250 μ L加え、超音波洗浄装置中で室温、5分間反応させた。*n*-ヘプタンを1 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、有機層を新たな試験管に移した。再度、*n*-ヘプタンを1 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、有機層を前述の試験管に移した。試験管中の有機層を、40℃以下の加温下で、窒素ガスを吹き付けて留去した。残渣に*n*-ヘプタンを0.4 mL加えて溶解し、GC-MS検液とした。

2.3 結果と考察

2.3.1 3-MCPD-Es及びG-Esの同時間接分析法の設計

同時間接分析法の各条件の検討は、[2.2.4 同時間接分析法の原案]に従った。初めに、エステル型分析種の分解に適したリパーゼの選定及び加水分解条件を選定した [2.3.2]。次いで、3-MCPD-EsとG-Esを同時分析するため、G-Esのエポキシ環を臭素により開環（臭素化）し、3-MBPDへと変換する条件を選定した [2.3.3]。最後に、分析工程の補正に用いる内標準 [2.3.4]、誘導体化・抽出条件 [2.3.5] を選定し、[2.2.5 酵素的間接分析法] を確立した。

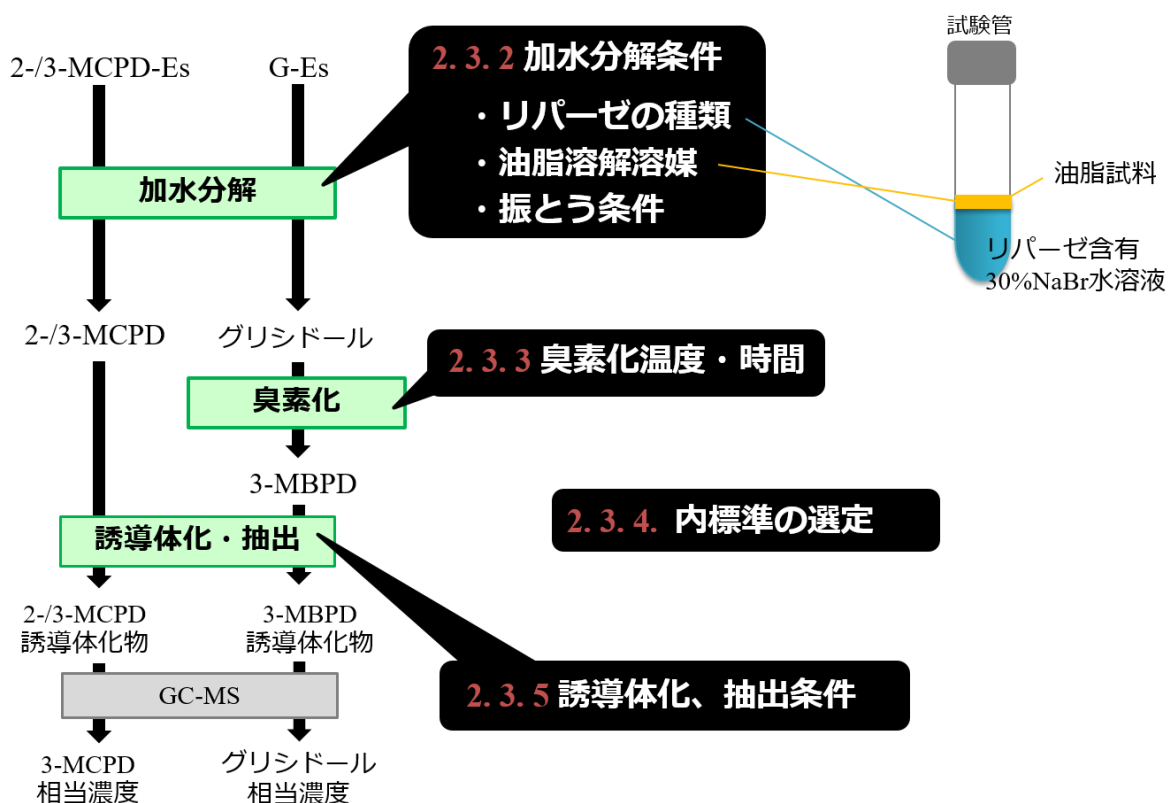


図2-4. 分析法の各条件の検討

2.3.2 加水分解条件

2.3.2.1 リパーゼの選定

リパーゼは由来や反応条件によって、位置、グリセリド、脂肪酸の種類、等への分解特異性が異なる。初めに、3-MCPDジエステル、モノエステル及びグリシドールのモノエステル分解に適したリパーゼの選定を行った。リパーゼは、安価、かつ、国内外で入手が可能（安定供給）である食品添加剤または試薬を用いた。3-MCPD-O/OとG-Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体油を油脂試料とした。各リパーゼ試薬を30%NaBr水溶液に溶解し、油脂試料に加えて振とうした。30%NaBr水溶液のpHは、各リパーゼの至適pH付近とした。

表2-3に示すように、*Candida rugosa*由来のリパーゼを用いた場合に、30分間の反応で3-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。*Aspergillus niger*、*Penicillium camembertii*由来のリパーゼでは120、180分間反応することで3-MCPD、グリシドールともに良好な回収率となった。

続いて、3-MCPD-O/OとG-Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したパーム固体脂を油脂試料とし、同様の添加回収実験を行ったところ、油脂試料がリパーゼ含有30%NaBr水溶液に分散しなかった（データ未記載）。リパーゼの至適温度は40～50℃程度であることが多く、油脂の上昇融点よりも低い。そこで、反応温度の変更ではなく、油脂試料を有機溶媒で溶解後にリパーゼによる加水分解を試みた。有機溶媒を添加した場合のリパーゼの加水分解効率を把握するため、3-MCPD-O/OとG-Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体を油脂試料として添加回収実験を行った。表2-4には、油脂溶解溶媒としてイソオクタンを0.2 mL添加した場合の結果を示す。他の溶媒を用いた場合の結果は、[2.3.2.2 油脂溶解溶媒の種類、添加量の選定]で述べる。

表2-3. 3-MCPD-O/O、G-Oを各20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体油からの3-MCPD、グリシドールの回収率。
 油脂溶解溶媒は無添加とした。加水分解に用いるリパーゼの種類、酵素量、反応時間以外の条件は [2.2.4
 同時間接分析法の原案] に従った。

リパーゼの由来	製品名	NaBr水溶液		反応時間 (分)	回収率 (%)	
		pH	酵素量 (U/mL)		3-MCPD	グリシドール
<i>Candida rugosa</i>	リパーゼAYアマノ30G	6.8	60	30	102	103
				60	103	103
				90	98	99
<i>Aspergillus niger</i>	リパーゼASアマノ	6.8	240	60	16	89
				120	102	100
				180	103	100
<i>Penicillium camembertii</i>	リパーゼGアマノ50	5.0	1,000	60	15	61
				120	60	107
				180	89	100
<i>Rhizopus oryzae</i>	リパーゼF-AP15	6.8	3,000	60	19	95
				120	47	108
				180	79	110

表2-4. 3-MCPD-O/O、G-Oを各20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体油からの3-MCPD、グリシドールの回収率。
 油脂溶解溶媒としてイソオクタン 0.2 mLを添加した。加水分解に用いるリパーゼの種類、酵素量、反応時間
 以外の条件は [2.2.4 同時間接分析法の原案] に従った。

リパーゼの由来	製品名	NaBr水溶液		反応時間 (分)	回収率 (%)	
		pH	酵素量 (U/mL)		3-MCPD	グリシドール
<i>Candida rugosa</i>	リパーゼAYアマノ30G	6.8	54	30	102	103
				60	101	97
	リパーゼAYSアマノ	6.8	54	30	98	102
	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	6.8	54	30	97	104
<i>Candida cylindracea</i>	リパーゼOF	6.8	54	30	96	105
	リパーゼMY	6.8	54	30	99	103
<i>Candida antarctica</i>	Lipase from <i>Candida antarctica</i>	6.8	80	30	27	104
<i>Aspergillus niger</i>	リパーゼASアマノ	6.8	500	60	11	97
				180	44	92
<i>Penicillium camembertii</i>	リパーゼGアマノ50	5.0	500	60	15	96
				180	43	102
<i>Rhizopus oryzae</i>	リパーゼF-AP15	6.8	500	60	10	92
				180	35	102

表2-4より、*C. rugosa*または*Candida cylindracea*由来のリパーゼを用いた場合、イソオクタンを添加しても、30分間の反応で3-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。*A. niger*、*P. camembertii*、*R. oryzae*由来リパーゼを用いた場合、3-MCPD回収率はイソオクタン無添加の時（表2-3）と比べて低下した。同じ*Candida*属である*C. antarctica*由来リパーゼも試行したが、3-MCPDは低回収であった。そのため、油脂試料中の3-MCPD-Es、G-Esの加水分解に適したリパーゼとして、*C. rugosa*と*C. cylindracea*由来のリパーゼを選定した。なお、これら以外のリパーゼを用いた場合でも、グリシドールの回収率は良好であった理由として、G-Esはモノエステルであるため、分解速度が速いことが推測される。*C. rugosa*以外のリパーゼを用いた添加回収実験において、3-MCPD-Es標準試薬としてモノエステルの3-MCPD-1-Oを添加した場合、ジエステルの3-MCPD-O/Oを添加した場合よりも3-MCPD回収率は高かった（データ未記載）。

上記の結果から、本分析法の加水分解に用いるリパーゼとして、*C. rugosa*または*C. cylyndracea*由来のリパーゼを選定した。続いて、表2-3の実験で用いたリパーゼAYアマノ30G以外の*C. rugosa*または*C. cylyndracea*由来のリパーゼ製品でも同様の結果が得られることを確認した。表2-4より、別製品の*C. rugosa*または*C. cylindracea*由来のリパーゼでも、30分間の反応で3-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。これ以降の実験は、*Candida rugosa*由来のリパーゼAYSアマノ（2016年4月より*C. cylindracea*由来に表記が変更された）を用いた。

続いて、加水分解に用いるリパーゼ含有30%NaBr水溶液中の最適な*C. rugosa*由来リパーゼの酵素量を選定するため、3-MCPD-O/OとG-Oを各20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体油を用いて添加回収実験を行った（図2-5）。30% NaBr水溶液中の*C. rugosa*由来リパーゼの酵素量は15~150 U/mLとした。

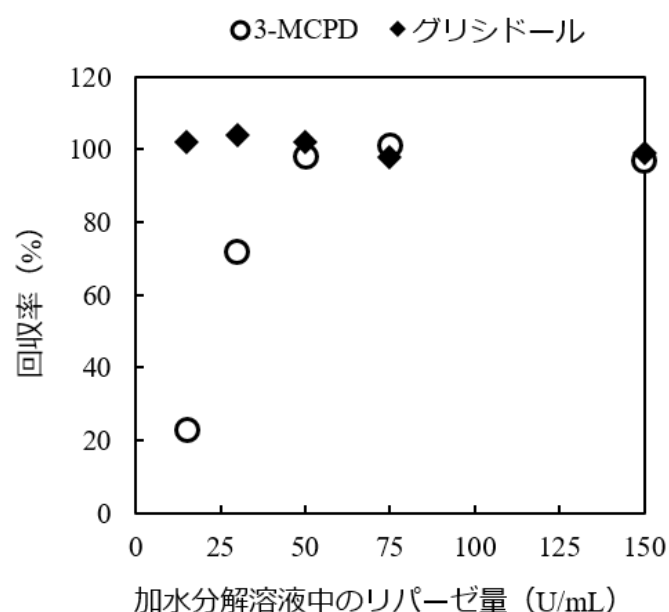


図2-5. 加水分解溶液（NaBr水溶液）中の*Candida rugosa*由来リパーゼの酵素量を変化させた場合の3-MCPD（O）、グリシドール（◆）の回収率。
3-MCPD-O/OとG-Oを各20 mg/kgとなるように添加したパーム液体油を試料として用いた。n=1。

図2-5より、3-MCPDの回収率は*C. rugosa*由来リパーゼの酵素量が50 U/mL以上、グリシドールの回収率は検討した全ての条件で良好であった。これらの結果より、加水分解溶液中の*C. rugosa*由来リパーゼの酵素量は安全域を加えて90 U/mLとした。

2.3.2.2 油脂溶解溶媒の種類、添加量の選定

室温で固体脂の場合、加水分解時に油脂試料が溶解せずリパーゼ含有30%NaBr水溶液中に分散しない。油脂の物性に関わらず分析できるようにするため、油脂試料を溶解し、かつ、リパーゼの加水分解を阻害しない溶媒と添加量を選定した。3-MCPD-O/O、2-MCPD-L/L、G-Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したパーム固体脂を油脂試料として用いた。これまでの実験においては、入手できなかった2-MCPD-Es標準を購入できたため、[2.3.2.2]以降の実験は2-MCPD-Esも分析対象とした。

油脂試料100 mg 及び*C. rugosa*リパーゼ含有30%NaBr水溶液3 mLに対し、各溶媒を0.2 mL添加し、60℃の恒温水槽で3分間加熱して油脂を溶解した。その後、室温で30分間振とうし、ヘキサン洗浄、誘導体化後にGC-MSを用いて分析し、回収率を確認した(図2-6)。

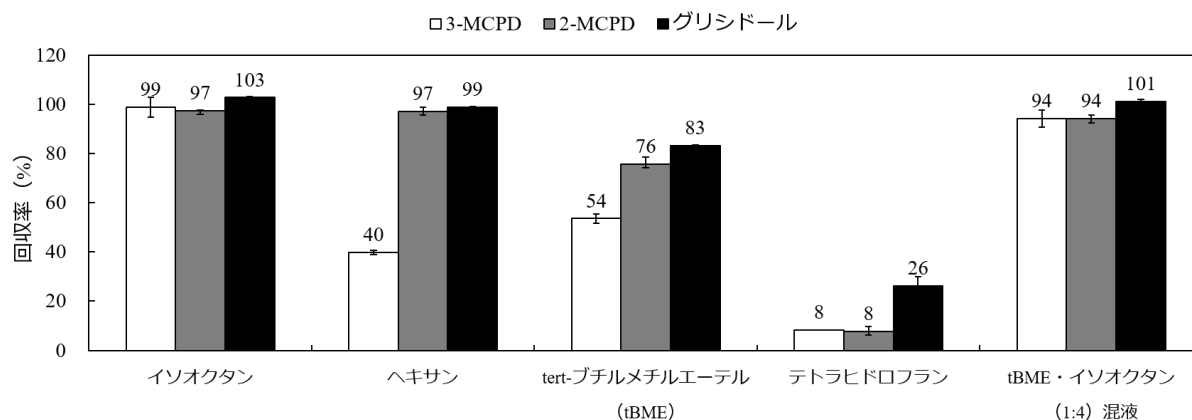


図2-6. 油脂溶解溶媒の種類による3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率への影響。油脂試料 100 mg、30%NaBr水溶液3 mLに対し、各溶媒は0.2 mL添加した。n=2。

イソオクタンとtert-ブチルメチルエーテル (tBME) ・イソオクタン (1:4) 混液の添加では、油脂試料を溶解し、かつ、良好な回収率が得られた。tBME単独の添加では、3-MCPD、2-MCPD、3-MBPDともに低回収率であったが、tBME・イソオクタン (1:4) 混液では回収率が改善した。そのためイソオクタンの添加は、*C. rugosa*由来リパーゼの加水分解活性を向上する効果があると推測した。イソオクタンは添加量を0.1~0.75 mLに変更した場合でも、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールは良好な回収率であった(データ未記載)。本分析法では、油脂試料100~110 mg、リパーゼ含有30% NaBr水溶液 3 mLに対して、イソオクタンを液体油には0.2 mL、固体脂には0.5 mL添加する条件を選定した。

2.3.2.3 振とう条件

C. rugosa リパーゼによる加水分解は、高速振とう機を用いて室温、30分間振とうする。一般的な振とう機の振とう方式である水平偏芯振動（図2-2：I）、縦往復（図2-2：II）、水平往復（図2-2：III）の何れを用いても加水分解が完了するのを確認するため、3-MCPD-O/OとG-Oを各20 mg/kgとなるように添加したエキストラヴァージンオリブ油（EVOO）を用いて添加回収実験を行った。その結果、水平偏芯振動方式の振とう機（高速振とう機 CM-1000（EYELA 東京理化工機、東京、日本））、縦往復方式の振とう機（SHAKER MW-1（アズワン、大阪、日本））を使用した場合は良好な回収率が得られたが、水平往復振とう方式の振とう機（BF-40LF（タイテック、埼玉、日本））を用いた場合には、3-MCPDが低回収になる傾向がみられた。そこで、振とう中の試験管の角度を水平から0～60°の傾きに置き、速度200 rpmで水平往復振とうした場合の回収率を確認した（表2-5）。

表2-5. 水平往復方式の振とう機（図2-2：III）を用いた場合、3-MCPD、グリシドールの回収率への試験管の角度の影響。n=2。

試験管の 水平からの角度	振とう時間 (分)	回収率 (%)	
		3-MCPD	グリシドール
0°	30	46, 44	99, 99
	45	52, 66	107, 110
	60	82, 79	109, 109
30°	30	64, 62	101, 100
60°	30	96, 97	107, 103

表2-5より、試験管の水平からの角度が0°の場合は、60分間振とうしても3-MCPDの回収率は約80%にとどまった。角度が30°の場合も、30分間の振とうでは3-MCPDの回収率は約63%であった。一方、角度が60°の場合は、3-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。角度が60°の場合の振とう中の試験管内の様子は、イソオクタ

ン・油脂層と水層がよく混合されていたが、角度が0、30°のときにはイソオクタン・油脂層と水層は分離された状態であった。試験管の水平からの角度が小さいとイソオクタン・油脂層に存在するエステル型分析種と、水層のリパーゼが接触する頻度が低くなるため、G-Esよりも分解しづらい3-MCPD-Esの回収率が低下したと考えた。そこで、水平往復振とう方式の振とう機を用いる場合には、試験管の角度を水平から60°とすることにした。これ以降の実験は、水平偏芯振動方式（図2-2：I）の振とう機を用いた。

2.3.2.4 結合する脂肪酸の種類、数

選定した*C. rugosa*リパーゼが、3-MCPD、グリシドールに結合する脂肪酸の種類、数に関わらず、加水分解できることを確認するため、食用油脂の主要な脂肪酸であるP、O、L、さらにラウリン酸(C12)が結合した3-MCPDジエステル、モノエステル、2-MCPDジエステル、グリシドールモノエステル標準試薬をそれぞれ20 mg/kgとなるよう添加したパーム液体油を油脂試料として添加回収実験を行った。

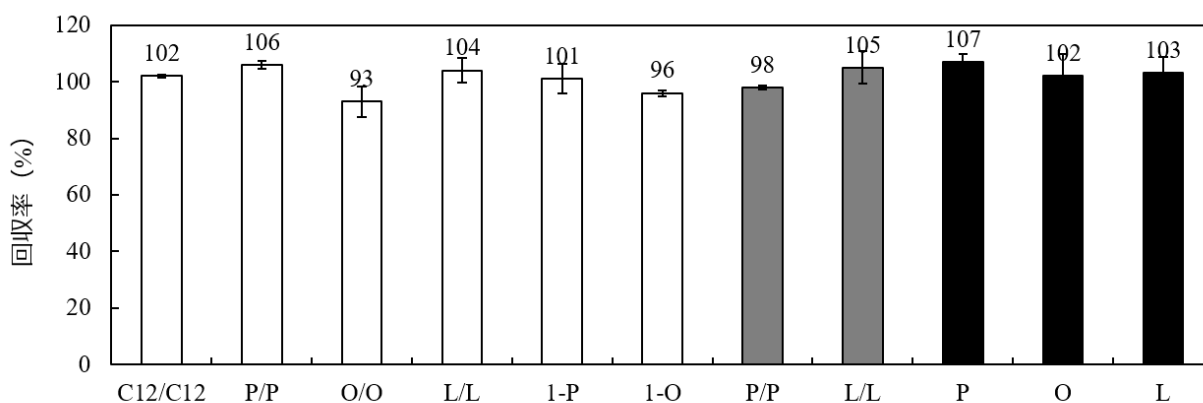


図2-7. 3-MCPD、2-MCPD、グリシドールに結合する脂肪酸の種類・数による

添加回収率への影響。 $n=3$ 。添加した標準は、□：3-MCPD-Es、■：2-MCPD-Es、

■：G-Es。結合する脂肪酸の種類は、C12：ラウリン酸、P：パルミチン酸、

O：オレイン酸、L：リノール酸。2-/3-MCPDジエステルはMCPD-脂肪酸/脂肪酸

3-MCPDモノエステルは3-MCPD-1-脂肪酸と表記。各標準試薬を20 mg/kgと

なるよう添加したパーム液体油を油脂試料とした。

図2-7より、3-MCPDの回収率は93~106%、2-MCPDの回収率は98、105%、グリシドールの回収率は102~107%と良好な結果が得られた。そのため、*C. rugosa*由来リパーゼは食用油脂の主要な脂肪酸が結合した3-MCPD、2-MCPD、グリシドールを加水分解できることが示された。

2.3.3 グリシドールの臭素化温度・時間

3-MCPD-EsとG-Esを同時分析するため、不安定なグリシドールを3-MBPDへと臭素化する方法を試みた。当初は、リパーゼ含有30%NaBr水溶液中で振とうすることで、加水分解と同時に臭素化も完了すると考えていた。しかし、3-MCPD-O/O、2-MCPD-L/L、G-Oを20 mg/kg添加したEVOOを油脂試料としたPBA誘導体化条件の検討時、反応温度を85℃から室温（25℃）に下げたところ、グリシドールの回収率が53%に低下した（データ未記載）。3-MCPD、2-MCPDの回収率は変動しなかった。さらに、3-MBPD-*d*₅ PBAのピーク面積は室温と85℃のどちらの反応温度でも同程度であったこと、検量線用の標準試料では3-MBPD/3-MBPD-*d*₅濃度比は減少しなかったことから、加水分解と誘導体化以降の操作に問題はなかったと判断した。そのため、[2.2.4]に記載した方法では、グリシドールから3-MBPDへの臭素化はPBA誘導体化時に完了すると考えられた。グリシドールの臭素化には加温が必要であると仮説をたて、加水分解後の試験管を、恒温水槽を用いて加温し（50~85℃）、グリシドールの回収率を確認した。

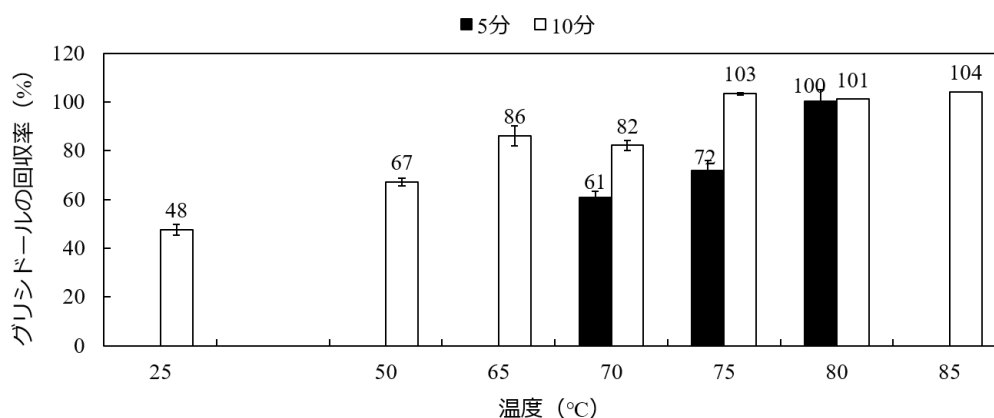


図2-8. グリシドールから3-MBPDへの臭素化に要する温度、時間の確認。
加温温度：25~85℃。加温時間：5分間（■）、10分間（□）。n=4。

図2-8より、反応時間が10分間（□）では75℃以上、5分間（■）では80℃以上の加温により、グリシドールの回収率は約100%となった。そこで、内標準添加前にグリシドールを臭素化するため、加水分解後に80℃、10分間加温する条件を選定した。なお、図2-8では加水分解後の試験管の加温を恒温水槽内で行ったが、ヒートブロック恒温槽に変更したところ、グリシドールの臭素化には80℃、5分以上必要であった（データ未記載）。試験管内の溶液温度が80℃に達温するまでの時間は、恒温水槽よりもヒートブロックの方が長いことが要因であると考えられる。そこで、グリシドールを臭素化するための加温には、恒温水槽を用いることを方法に明記した。

2.3.4 内標準の選定

間接分析法は、遊離型分析種を誘導体化して分析する。誘導体化・抽出、等の工程を補正するために重水素標識された分析種（ d_5 体）を内標準として加える。本分析法では、エステル型分析種は全て遊離型分析種に加水分解できると仮定し、加水分解・グリシドールの臭素化工程後に遊離型分析種- d_5 を添加した。加水分解・グリシドールの臭素化の精度を確認するため、なたね油、ごま油、米ぬか油、パーム液体油、パーム固体脂2種を油脂試料とし、遊離型分析種- d_5 を用いた場合と、油脂試料採取時にエステル型分析種- d_5 を添加した場合の3-MCPD相当濃度、グリシドール相当濃度を比較した（図2-9）。

図2-9より、遊離型分析種- d_5 、エステル型分析種- d_5 のどちらを補正に用いた場合でも、同等の遊離型相当濃度が得られた。そのため、本分析法のリパーゼ加水分解において、油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esは、遊離型の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールに完全に分解されていることが示された。本分析法の加水分解・グリシドールの臭素化は補正する必要がないことが示された。

AOCS Official Method 3法では加水分解工程も補正（加水分解効率、分析種間の意図しない変換、等）が必要であるため、エステル型分析種- d_5 を油脂試料採取時に添加している。検量線用の標準試料も、エステル型分析種の標準試薬とエステル型分析種- d_5

を用いており、油脂試料と同様の操作が必要である。一方、本分析法では遊離型の標準試薬と遊離型分析種- d_5 を用いているため、検量線用の標準試料は誘導体化以降の操作のみであるため、簡便である。

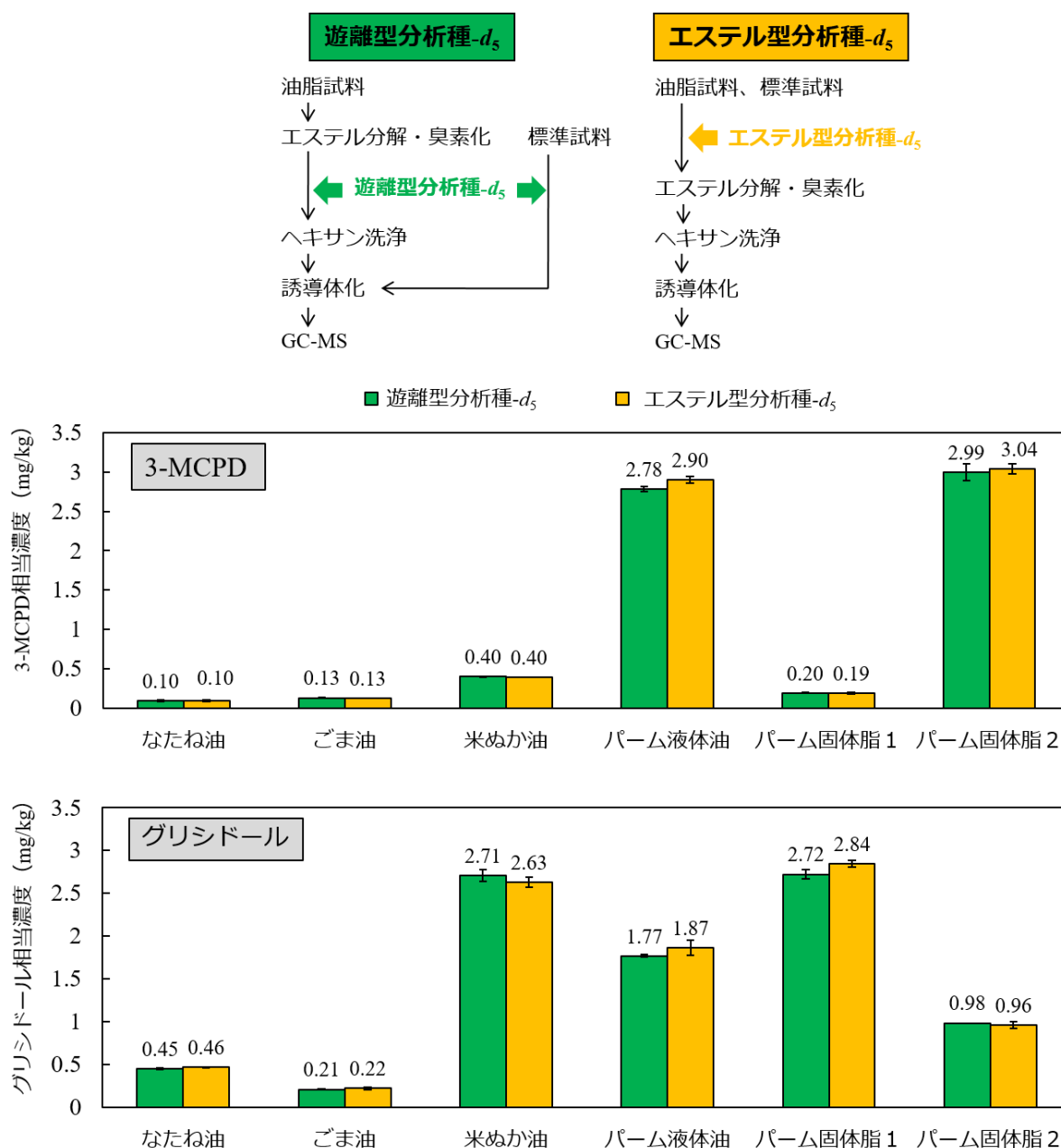


図2-9. 内標準補正の違いによる分析値の比較。 $n=3$ 。

- : 加水分解・グリシドールの臭素化後に“遊離型分析種- d_5 ”を添加
- : 油脂試料の採取後に、“エステル型分析種- d_5 ”を添加。

2.3.5 誘導体化、抽出条件

PBA誘導体化には加温は不要であった [2.3.3]。操作を簡便にするため、誘導体化温度を室温（25℃）、操作を図2-10に示す改善案①または改善案②に変更し、検量線用の標準試料を誘導体化、抽出を行った。誘導体化、抽出効率を比較するため、各内標準（ d_5 体）のピーク面積を確認した。

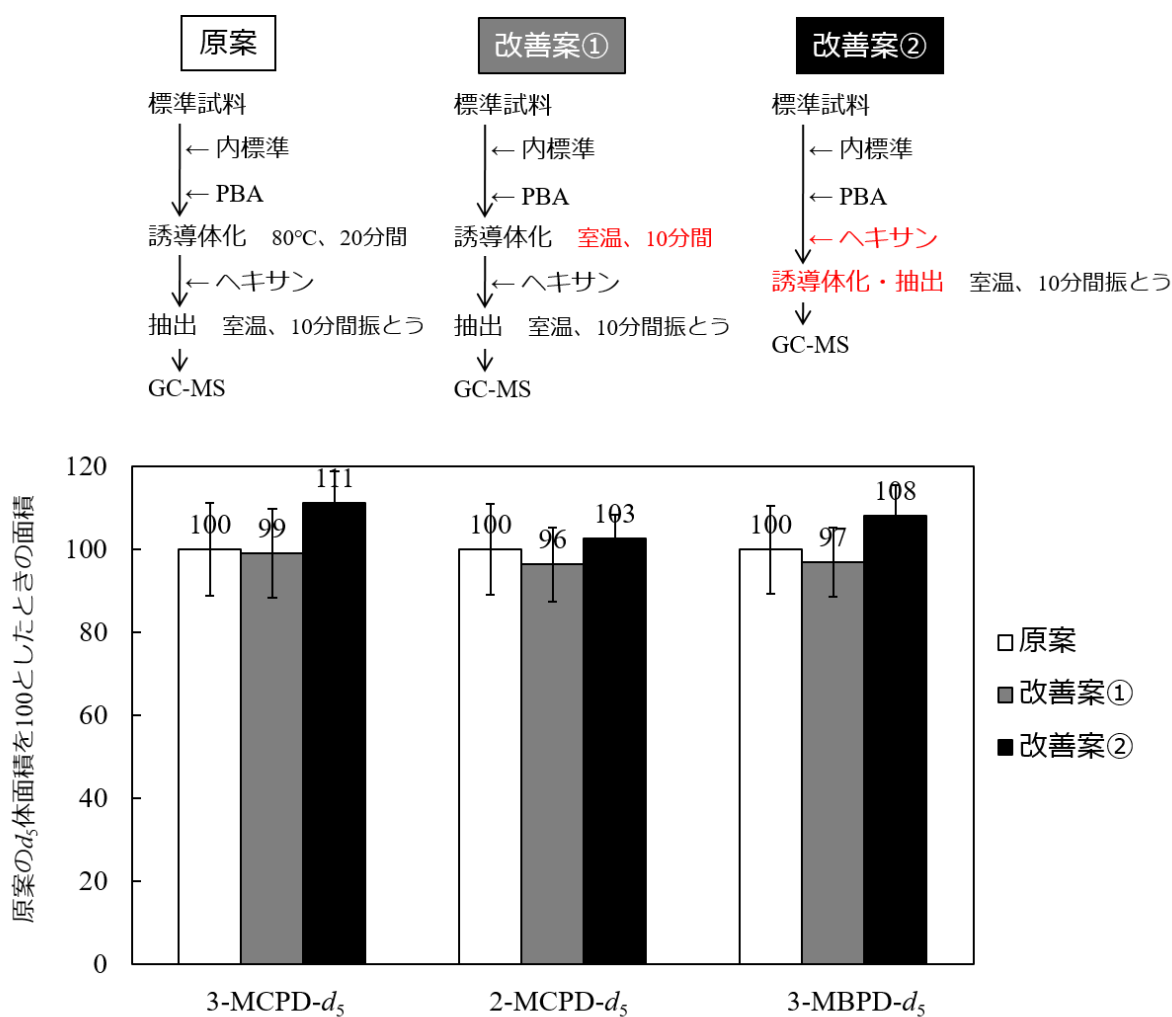


図2-10. 誘導体化、抽出条件の違いによる、内標準のピーク面積の相対値比較。n=6。

ピーク面積は原案 = 改善案① ≤ 改善案②であった。また、改善案②は誘導体化、抽出を同時に行うことができるため、操作の簡便性の観点から改善案②を選定した。さ

らに、分析感度を向上させるため、抽出後の有機層に窒素ガスを吹きかけ、濃縮する工程を加えた。なお、検液への水分の混入を防ぐため、脱水用の硫酸ナトリウム存在下で濃縮を行った。

2.3.6 酵素的間接分析法の評価

2.3.6.1 加水分解時のpH

[2.3.2～2.3.4] までの条件検討により、酵素的間接分析法を確立した。以降の実験は、[2.2.5 酵素的間接分析法] に従った。

分析種間の意図しない変換にはpH変化が関与することが報告されている。加水分解時のpHを選定するため、pHの異なるリパーゼ含有30%NaBr水溶液 (pH 4.5～6.8) を用いて、3-MCPD-Esから3-MBPD (グリシドール) への変換の割合を確認した。

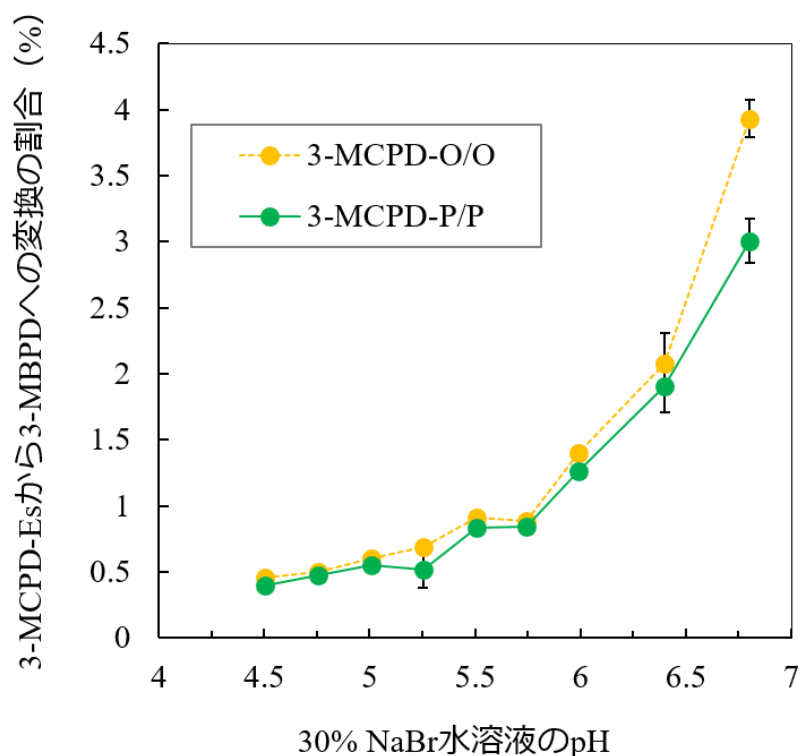


図2-11. NaBr水溶液のpHの違いによる3-MCPD-Esから3-MBPDへの意図しない変換の割合。添加した標準：● 3-MCPD-O/O、● 3-MCPD-P/P。n=2。

図2-11より、3-MCPD-O/Oまたは3-MCPD-P/P標準試薬を、高濃度である50 mg/kgとなるように添加した場合、3-MBPDへの意図しない変換の割合は、30%NaBr水溶液のpHが5.75以下で1%未満に抑えられることが分かった。また、pH 5.0のとき、50 mg/kg G-Esから3-MCPDへの変換は生じなかった（データ未記載）。この結果から、加水分解時の30%NaBr水溶液のpH条件として、分析種間の意図しない変換が1%未満かつ、リパーゼの至適pHに近いpH 5.0~5.5を選定した。なお、AOCS Cd29aを用いた場合の意図しない変換の割合は、3-MCPD-O/Oから3-MBPD（グリシドール）へは2.7%、3-MCPD-P/Pから3-MBPD（グリシドール）へは3.2%であった。本分析法は他法と比べ、意図しない変換の割合が小さいことが示された。

2.3.6.2 加水分解の温度、時間

本分析法の加水分解は、操作の利便性から室温（25℃）で行う。加水分解温度の適用範囲を確認するため、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加したEVOOを試料として、10~55℃で加水分解を行い、回収率を確認した（図2-12）。

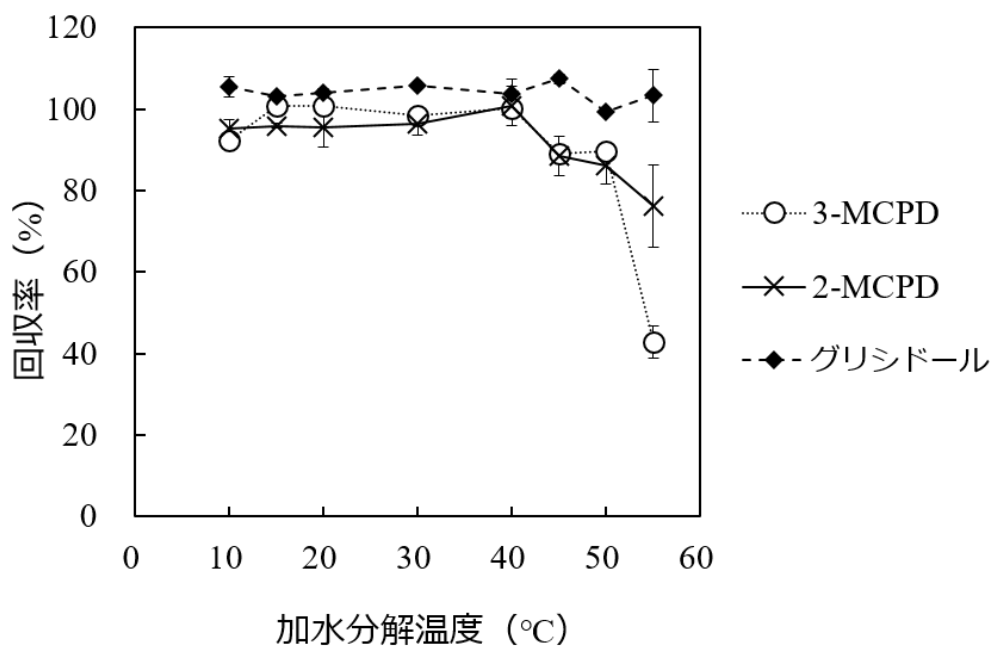


図2-12. 加水分解温度の違いによる3-MCPD (○)、2-MCPD (×)、グリシドール (◆) の回収率。n=2。

図2-12より、10～45℃までは3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られたが、50℃以上では3-MCPD、2-MCPDの回収率が低下した。*C. rugosa*由来のリパーゼの至適温度は40～45℃であるため、50℃以上ではリパーゼ活性が低下したと推測した。

次いで、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの加水分解が30分間で完了していることを確認するため、上記と同じ試料を用いて、室温で20秒間 ボルテックス、または5、10、15、20、30分間高速振とう機を用いて振とうし、回収率を確認した。

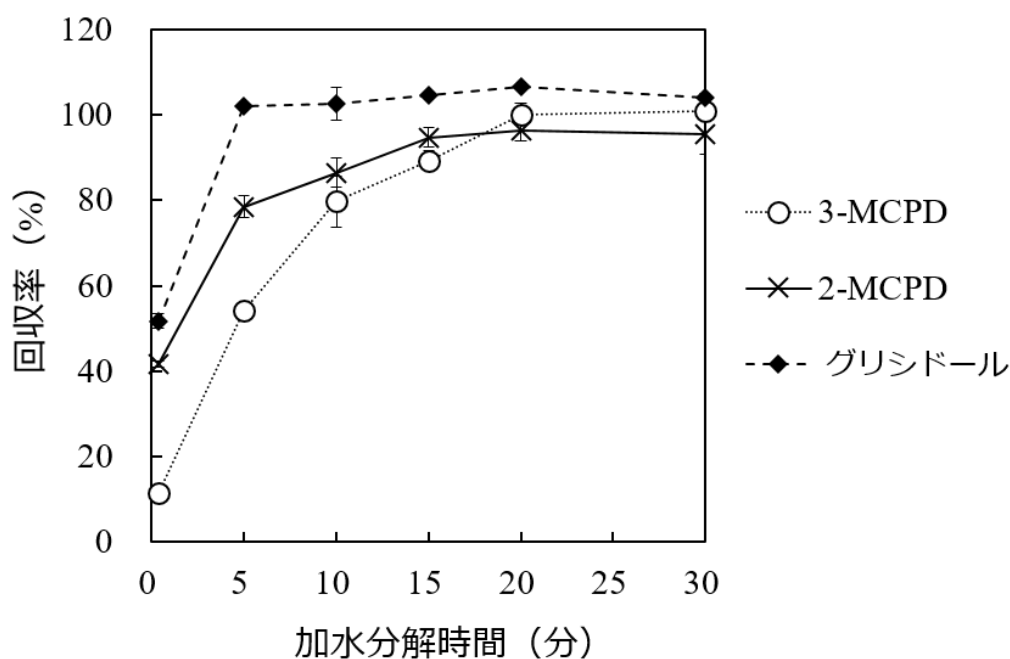


図2-13. 加水分解時間と3-MCPD (○)、2-MCPD (×)、グリシドール (◆) の回収率の関係。n=2。

図2-13より、G-Oは5分間以内、2-MCPD-P/Pは10～15分間、3-MCPD-O/Oは15～20分間で加水分解が完了することが確認できた(図2-13)。G-Esの加水分解が最も速く完了した理由として、G-Esは脂肪酸が1つ結合した構造(モノエステル)であることが考えられる。図示していないが、モノエステルである3-MCPD-1-Oは、ジエステルである

3-MCPD-O/Oよりも加水分解に要する時間は短かった。“1位と3位”に脂肪酸が結合した2-MCPDジエステルの方が、“1位と2位”に脂肪酸が結合した3-MCPDジエステルよりも加水分解が速く完了したことから、*C. rugosa*由来リパーゼは、“2位”に結合した脂肪酸の分解に最も時間を要すると考えられた。

2.3.6.3 添加回収実験

確立した酵素的間接分析法 [2.2.5] において、再度、複数メーカーのリパーゼ試薬を用いて、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加したEVOOを油脂試料として、添加回収実験を行った。

表2-6. 3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加したEVOOを酵素的間接分析法で分析した場合の回収率。4製品の*Candida rugosa*または*Candida cylindracea*由来リパーゼを用いた。n=2。

<i>C. rugosa</i> (<i>C. cylindracea</i>) 由来リパーゼの製品名	回収率 (%)				
	3-MCPD		2-MCPD		グリシドール
リパーゼOF	96.6,	95.6	98.2,	101.5	104.6, 104.7
リパーゼMY	99.0,	99.3	98.0,	96.3	102.1, 104.7
Lipase from <i>Candida rugosa</i>	95.3,	98.5	100.5,	97.2	104.1, 103.9
リパーゼAYSアマノ	98.8,	97.3	94.6,	95.3	101.6, 96.3

表2-6から、本分析法の加水分解に用いる*C. rugosa*または*C. cylindracea*由来のリパーゼは、分析法の条件検討に用いたリパーゼAYSアマノ以外の製品を用いた場合でも、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率は良好であることが示された。

続いて、確立した酵素的間接分析法 [2.5.5] の食用油脂への適用を確認するため、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各2 mg/kgとなるように添加した油脂を試料として添加回収実験を行った (図2-14)。

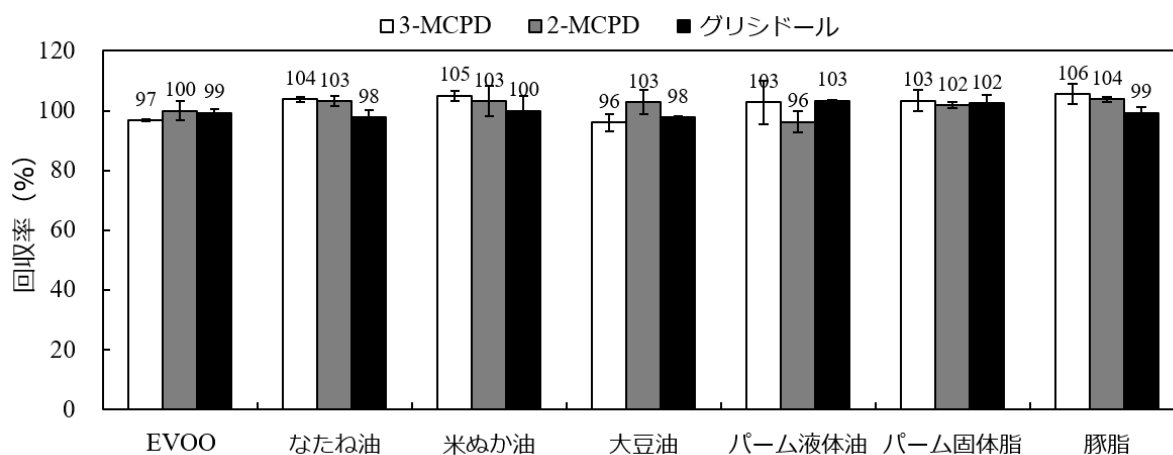


図2-14. 3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各2 mg/kgとなるよう添加した食用油脂を、酵素的間接分析法を用いて分析した場合の回収率。

□ : 3-MCPD、■ : 2-MCPD、■ : グリシドール。n=2。

図2-14より、食用油脂の種類によらず、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。

2.3.6.4 AOCS Cd29aとの分析値比較

最後に、酵素的間接分析法 [2.2.5] とAOCS Cd29a [2.2.10] を用いて油脂試料15種を分析し、分析値に相関が得られることを確認した。油脂試料は、なたね油、大豆油、米ぬか油、ごま油、グレープシードオイル、パーム固体脂 2種、パーム液体油、パームステアリン、極度硬化大豆油、豚脂 2種、牛脂、EVOO、エステル型分析種 3種を20 mg/kg添加したEVOOを用いた。縦軸に酵素的間接分析法、横軸にAOCS Cd29aで得られた遊離型相当濃度をプロットした結果を図2-15、分析値比較のための重み付きデミング回帰⁵¹⁾の結果を表2-7に示す。重み付きデミング回帰は、分析の標準偏差 (n=2) が

分析値に比例する（変動係数が一定）と仮定し、データ解析ソフトR⁵²⁾のパッケージ mcr⁵³⁾を用いて計算を行った。

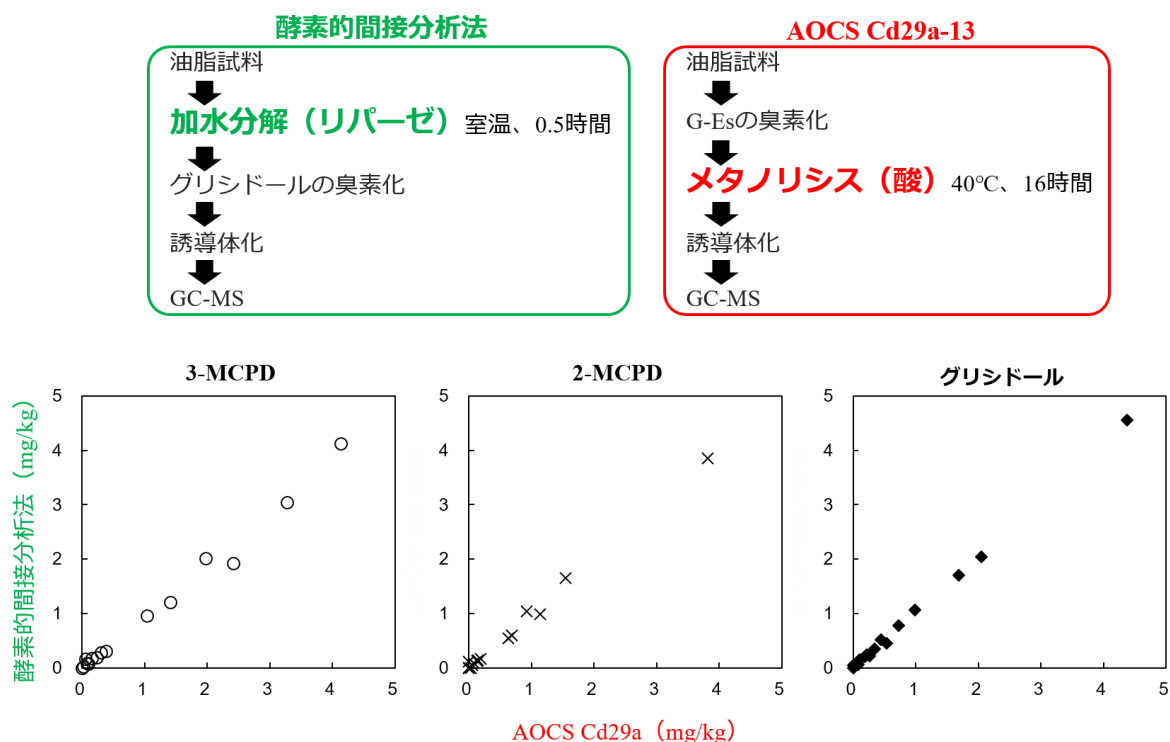


図2-15. 酵素的間接分析法 [2.2.5] とAOCS Cd29a [2.2.10] から得られた分析値。n=2。
分析した油脂試料15種は、なたね油、大豆油、米ぬか油、ごま油、
グレープシードオイル、パーム固体脂2種、パーム液体油、パームステアリン、
極度硬化大豆油、豚脂2種、牛脂、EVOO、エステル型分析種3種を20 mg/kgと
なるよう添加したEVOO。縦軸：酵素的間接分析法から得られた分析値、
横軸：AOCS Cd29aから得られた分析値。

油脂試料15種中の遊離型相当濃度の範囲は、3-MCPD 0.02～3.05 mg/kg、2-MCPD 0.05～1.65 mg/kg、グリシドール 0.05～2.04 mg/kgであった。なお、極度硬化大豆中の3-MCPDと2-MCPD、EVOO中の2-MCPDとグリシドールはどちらの分析法でも検出されなかった。

表2-7. 酵素的間接分析法とAOCS Cd29を用いて分析した油脂試料15種の分析値に対する重み付きデミング回帰結果。

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPD	切片	0.002	0.018	-0.036	0.041
	傾き	0.990	0.104	0.764	1.216
2-MCPD	切片	0.003	0.004	-0.007	0.013
	傾き	0.961	0.045	0.859	1.064
グリシドール	切片	-0.012	0.034	-0.087	0.064
	傾き	1.053	0.084	0.867	1.239

a) 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した。

表2-7より、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに、傾きと切片の95%信頼区間はそれぞれ1、0を含むことから、酵素的間接分析法から得られた分析値とAOCS Cd29aから得られた分析値は同等であると判断した。

2.3.7 他の間接分析法との比較

3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの加水分解に*C. rugosa* (*C. cylindracea*) 由来リパーゼを用いることにより、分析種間の意図しない変換を抑制し、かつ、迅速な新規間接分析法を開発することができた。酵素的間接分析法と同時期に開発されたAOCS Official Method 3法は、分析種間の意図しない変換を防ぐために、Cd29aは弱酸性、Cd29bは弱アルカリ性かつ低温で反応するため、メタノリシスに16時間を要する。Cd29cのメタノリシスは短時間であるが、1つの試料につき2つの方法で分析する必要がある。これに対し、酵素的間接分析法のリパーゼを用いた加水分解は30時間で完了し、3-MCPD、2-MCPD、グリシドール相当濃度を同時に定量できる。

また、AOCS Official Method 3法は、内標準補正にエステル型分析種の重水素標識物 (*d*₅) を用いる。標準と内標準もメタノリシスが必要であるため、検量線用の標準試

料の調製は、油脂試料と同様の操作が必要となる。一方、酵素的間接分析法は、加水分解中の意図しない変換は他法と比べて小さく、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの加水分解効率は高いことから、遊離型分析種-d₅を内標準として用いることができる。そのため、検量線用の標準試料の調製は、誘導體化以降の工程のみで済むため簡便である。これらの理由から、酵素的間接分析法は、AOCS Official Method 3法と比べて迅速かつ簡便な方法である。

また、加水分解にリパーゼを用いた方法がChungらによって報告されている⁵⁴⁾。この方法は、3-MCPD-Es、2-MCPD-Esを分析対象とし、*Candida antarctica*リパーゼ含有1% Triton-X100溶液中で40℃、16時間振とうすることで加水分解を行う。また、Seefelderらは、腸内モデルにおいてパンクレアチン(膵臓リパーゼを含む)を用いて3-MCPD-P/Oを37℃で加水分解する場合、90分間を要することを報告している⁵⁵⁾。以上のことから、本研究において選定した*Candida rugosa*由来リパーゼは、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの迅速な加水分解に適したリパーゼである。

2.4 まとめ

食用油脂中に3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの含有が明らかになった当初、これらエステル型分析種の精度の高い分析法は確立されていなかった。食用油脂の安全保証のため、エステル型分析種を迅速、かつ、分析種間の意図しない変換を抑制しながら加水分解し、同時定量する方法の開発を試みた。開発した分析法に対し、単一機関において性能を評価した結果、

- 1) 加水分解の手法として*Candida rugosa* (または*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼを選定したことで、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの各エステル型分析種の加水分解を30分間以内に完了させることができた。また、AOCS Cd29aにおいて3-MCPD-Esからグリシドールへの意図しない変換の割合は3%であったが、酵素的間

接分析法においては加水分解溶液である30%NaBr水溶液のpHを5.0~5.5にするこ
とで、意図しない変換の割合を0.5%未満に抑制できた。

- 2) 単一機関において、分析法の性能を評価するため、①C12、P、O、Lが結合した
エステル型分析種の標準試薬、②様々な食用油脂を用いた添加回収実験を実施し
たところ、良好な回収率が得られた。そのため、酵素的間接分析法はエステル型
分析種に結合する脂肪酸の種類・数、油種によらず適用できることが示された。

- 3) 同時期に開発されたAOCS Official MethodのCd29a、Cd29bは、メタノリシスに16
時間を要する。また、Cd29cは1試料を2つの方法で分析する必要がある。酵素的間
接分析法の加水分解は30分間で完了するため、迅速である。さらに、補正には遊
離型分析種- d_5 を用いるため、検量線用の標準試料の調製は誘導體化以降の操作の
みであり、簡便である。そのため、開発した酵素的間接分析法は、実用性が高く、
食用油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの定量法として適した方法であると
考えられる。

第3章 合同試験

3.1 序論

酵素的間接分析法は、AOCS Official Method 3法と比べて迅速かつ簡便であり、実用性の高い分析法である。本法を、市場に流通する食品の安全性保証や国内の含有実態調査に活用してもらうため、日本油化学会に提案した。日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法に登録するため、2013年2月に日本油化学会規格試験法委員会『MCPD脂肪酸エステル等（間接法）小委員会』を設立した。本小委員会の参加機関は、株式会社ADEKA、地方独立法人大阪市立工業研究所（現、大阪産業技術研究所 森之宮センター）、花王株式会社、キューピー株式会社、株式会社J-オイルミルズ、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、日清オイリオグループ株式会社、一般財団法人日本食品分析センター、公益社団法人日本食品油脂検査協会、一般社団法人日本油料検定協会、一般財団法人日本冷凍食品検査協会（現、日本食品検査）、株式会社ハウス食品分析テクノサービス、不二製油株式会社、最後に筆者が所属するハウス食品グループ本社（コーディネーター）の計14機関である。基準油脂分析試験法の基準法は、①実用に供しうる室間再現精度、定量限界を有すること、②分析条件及び方法、測定データが論文で公表されていること、③機器、標準物質の入手で試験法の普及が妨げられないこと、④国際的に整合性がとれること、を満たす必要がある。第2章では、単一機関において性能評価、改良を行い、酵素的間接分析法を確立した。

本章では、全13機関にて合同試験を実施し、酵素的間接分析法が実用に供しうる室間再現精度を持つことを確認すること、本法を基準油脂分析試験法 基準法として登録することを目的とした。

3.2 方法

3.2.1 油脂試料の選定と保存試験

本分析法の特徴は、エステル型分析種の分解にリパーゼを用いることである。リパーゼによる加水分解は水系条件下で行うため、固体脂への適用が懸念視された。そこで、合同試験では、固体脂への適用を確認することが重要課題であった。その他の試料は、市場の動向及び3-MCPD-Es、G-Es濃度から重要性が高い油脂を選定した。油脂試料の種類は、パーム固体脂（上昇融点50℃）、パーム液体油、なたね油、米ぬか油の4種、習熟試料はエキストラヴァージンオリーブ油（EVOO）とし、市販品を使用した。初めに、合同試験期間における、油脂試料の保存条件を選定するため、3つの保存温度帯（室温（25℃）、冷蔵（5℃）、冷凍（-18℃））で各油脂試料を84日間保存し、3-MCPD相当濃度、グリシドール相当濃度の経時変化を確認した。

3.2.2 試料の調製

蓋付き三角フラスコに、エステル型分析種の標準試薬を添加し、窒素ガスを吹き付けてトルエン（標準試薬の溶解溶媒）を留去した。その後、油脂を採取し、各油脂の上昇融点より10℃高い温度で加温しながら1時間攪拌した。その後、1.5 mL容褐色バイアルに小分けした。小分けしたバイアルから無作為に6バイアルを選定し、1バイアルにつき2回分析し、試料の均質性を確認した。油脂試料中の遊離型相当濃度は表3-1に示す。試料配布前に、No.1～6までの6試料とエステル型分析種を添加していない油脂（ブランク）を分析し、添加回収率を確認した。各機関には、遊離型相当濃度と油種が非明示である試料6種（容器にはサンプルNo.のみを記載）と習熟試料として遊離型相当濃度と油種が明示された試料1種の計7種の油脂試料を配布した。

表3-1. 合同試験用の油脂試料。No.1, 4 なたね高含有は同一試料を非明示で配布した。

No.	油種	意図	ヨウ素価	各遊離型分析種相当濃度 (mg/kg) ^{a)}					
				3-MCPD		2-MCPD		グリシドール	
				ブランク ^{b)}	添加 ^{c)-1}	ブランク ^{b)}	添加 ^{c)-2}	ブランク ^{b)}	添加 ^{c)-3}
1, 4	なたね	高含有 反復	111	0.08	3.50	0.05	3.68	0.20	4.44
2	パーム	固体脂	43	2.55	0.85	1.31	0.45	0.93	1.08
3	パーム	液体油	66	3.33	- ^{d)}	1.82	- ^{d)}	2.32	- ^{d)}
5	なたね	低含有	111	0.08	0.54	0.05	0.56	0.20	0.61
6	米ぬか	日本特有	104	0.28	1.09	0.14	1.15	0.78	2.77
	EVOO	習熟用	82	0.04	4.17	nd	4.11	0.03	4.35

nd：不検出

a) 各試料中の遊離型分析種相当濃度

b) 標準試薬無添加の油脂の分析値

c) 添加した^{c)-1} 3-MCPD-O/O、^{c)-2} 2-MCPD-P/P、^{c)-3} G-O標準試薬の遊離型相当濃度

d) 標準試薬無添加

3.2.3 合同試験

本合同試験は、国内の13機関によって実施された。分析法は [第2章の2.2.5～2.2.8] を使用した。参加機関は、初めに習熟試料（明示）を分析し、次いで、No. 1～6の非明示試料をそれぞれ2回分析した。得られた3-MCPD、2-MCPD、グリシドール遊離型相当濃度がコーディネーターに報告された。コーディネーターは、日本油化学会の定める『基準油脂分析試験法 共4-2013 合同実験実施の手引き』⁵⁶⁾に従い、Cochran検定とDixon検定で外れ値を排除後、統計処理を行い、再現性を確認した。

3.3 結果と考察

3.3.1 保存試験

3つの保存温度帯（室温（25℃）、冷蔵（5℃）、冷凍（-18℃））で84日間保存したパーム液体油とパーム固体脂の3-MCPD及びグリシドール相当濃度の経時変化を図3-1に示した。

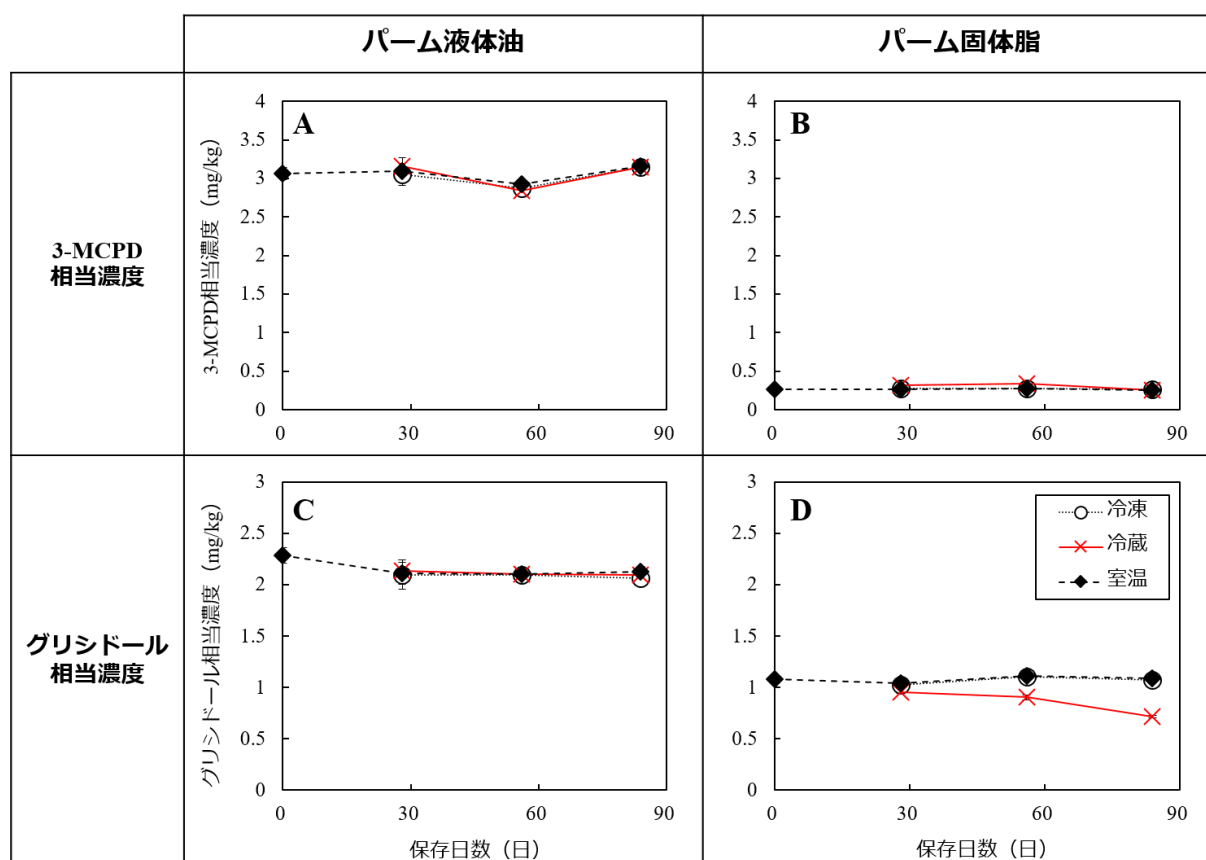


図3-1. 保存温度の違いによる、パーム液体油、パーム固体脂の3-MCPD、グリシドール相当濃度の変移。○：冷凍（-18℃）、×：冷蔵（5℃）、◆：室温（25℃）。n=2。

A：パーム液体油の3-MCPD相当濃度、B：パーム固体脂の3-MCPD相当濃度、

C：パーム液体油のグリシドール相当濃度、D：パーム固体脂のグリシドール相当濃度

冷蔵保存したパーム固体脂では、グリシドール相当濃度は84日間で33%減少した（図3-1D：×）。室温及び冷凍保存下のパーム固体脂では、グリシドール相当濃度（図

3-1D：◆、○）、全温度帯の3-MCPD相当濃度（図3-1B）には大きな減少は見られなかった。また、室温で液体であるパーム液体油（図3-1A、C）、なたね油、米ぬか油、EVOO（データ未記載）では、全温度帯で3-MCPD相当濃度とグリシドール相当濃度に変化はなかった。また、合同試験試料以外の試料でも同様の傾向が見られた。パーム半固体脂（上昇融点35℃）、パーム固体脂（47℃）を冷蔵保存した場合、約70日間の保存でグリシドール相当濃度（G-Es）はそれぞれ44%、36%減少した⁵⁷⁾。

固体脂のみ、冷蔵保存によってG-Es濃度が減少する要因は不明であるが、AOCS Official Method 3法の合同試験においても、油脂試料を室温または冷凍保存した場合は3-MCPD-Es、G-Es濃度ともに変化がなかったのに対し、冷蔵保存した場合はG-Es濃度のみ減少することが報告されている。また、Matthäusらは、異なる温度帯（-20、5、10、15、20℃）でパーム油を一ヶ月間保存した場合、-20℃及び20℃では3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの濃度はほとんど変化しないが、5、10、15℃ではG-Es濃度のみ減少することを明らかにした⁵⁸⁾。合同試験では、油脂試料は室温で配送し、参加機関では到着から分析まで、室温、暗所で保管とした。

3.3.2 試料の添加回収率、均質性の確認

合同試験6試料のうち油脂試料No.3 パーム液体油を除く5試料はエステル型分析種の標準試薬を添加して、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Es濃度を調整した。標準を添加した油脂試料の均質性を確認した。No.1, 4 なたね高含有、No.6 米ぬかの一元配置分散分析の結果を表3-2に示す。

表3-2. 油脂試料No.1, 4なたね高含有とNo. 6米ぬかの均質性確認。油脂試料を小分けしたバイアルから無作為に6バイアルを選定した。1バイアルにつき2回分析し、一元配置分散分析を行った。

No	油種			3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
1, 4	なたね	高含有	分析した平均値 (mg/kg)	3.31	3.62	4.92
			P値	0.61	0.22	0.27
6	米ぬか		分析した平均値 (mg/kg)	1.48	1.41	3.64
			P値	0.15	0.19	0.37

油脂試料No.1, 4なたね高含有、No.6米ぬかともに、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールのP値は0.05よりも大きかったため、有意差がないことが示された(表3-2)。油脂試料No.2パーム固体脂、No.5なたね低含有も同様に均質性を確認した結果、有意差がないことが示された(データ未記載)。

続いて、エステル型分析種の標準試薬を添加して調製した油脂試料の添加回収率を確認した(表3-3)。

表3-3. 合同試験用の油脂試料の添加回収率。n=2。

No	油種		回収率 (%)		
			3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
1, 4	なたね	高含有	102.6, 105.8	102.1, 106.5	106.5, 107.3
2	パーム	固体脂	101.2, 103.9	105.4, 107.0	106.7, 104.7
5	なたね	低含有	102.6, 104.0	100.7, 100.0	104.0, 102.4
6	米ぬか		103.6, 113.7	103.4, 105.1	106.4, 105.0
習熟	EVOO		106.9, 108.2	95.1, 95.1	109.8, 109.2

表3-3より、エステル型分析種を添加したNo. 1、2、4、5、6、習熟試料の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率は95~114%とやや高い傾向は見られたが、標準試薬は問題なく添加されていることが確認できた。

以上の結果から、表3-1に示した油脂試料は合同試験用の試料として適していると判断し、参加機関に配布した。

3.3.3 合同試験

参加機関が合同試験に使用した振とう機、キャピラリーカラム、GC-MSの情報を表3-4に示す。加水分解に用いる振とう機は、図2-2に記載した振とう方式によって分類した。Ⅰの水平偏芯振動振とう機（例、CM-1000）では、試験管を鉛直に置き、速度1,800 rpmとした。Ⅱの縦往復振とう機では、試験管を鉛直に置き、速度200 rpm、振幅約4 cmとした。Ⅲの水平往復振とう機（例、BF-40LF（タイテック製、埼玉、日本））では、試験管を水平から60°の傾きに置き、速度250~400 rpm、振幅2~3 cmとした。キャピラリーカラムはAgilent Technologies製 EZ-guard VF-5ms、またはEZ-guard VF-17ms（長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、5 mガードカラム付き）に相当するカラムを参加機関が選定した。

参加機関が分析した各油脂試料中の遊離型相当濃度を表3-5a、表3-5b、表3-5cに示す。Cochran検定によって外れ値と判定された分析値をアスタリスクで示した。Dixon検定では、全分析値が外れ値と判定されなかった。外れ値を排除後、各油脂試料の分析種毎に併行精度、室間再現精度を確認した。

表3-4. 参加機関が合同試験に使用した振とう機、キャピラリーカラム、GC-MS

機関 コード	振とう機 ^{a)}	キャピラリーカラム		GC-MS		
		種類	ガードカラム	注入方式	メーカー	装置名
A	I	VF-5ms	EZ-guard	スプリットレス	Agilent Technologies	5975C TAD
B	I	DB-5ms	無	スプリットレス	Thermo Fisher Scientific	TSQ QuantumGC XLS
C	III	DB-5ms	DuraGuard	スプリットレス、PTV ^{b)}	Shimadzu	GCMS-QP2010
D	II	HP-5ms	無	スプリットレス	Agilent Technologies	5975C inertXL
E	I	VF-5ms	EZ-guard	スプリットレス	Agilent Technologies	5975C
F	II	VF-5ms	EZ-guard	スプリットレス	Thermo Fisher Scientific	TRACE1310, ISQLT
G	I	SLB-5ms	無	スプリットレス	Agilent Technologies	5975C inertXL
H	III	DB-5ms	無	スプリットレス	Agilent Technologies	5975C
I	II	HP-5ms	無	スプリットレス	Shimadzu	GCMS-QP2010 Plus
J	I	VF-5ms	無	スプリットレス	Varian	320-MS
K	II	DB-5ms	無	スプリットレス	Agilent Technologies	5973 Network
L	I	SLB-5ms	無	スプリットレス	Shimadzu	GCMS-QP5050A
M	II	VF-5ms	EZ-guard	スプリットレス	Shimadzu	GCMS-QP2010

^{a)} 加水分解時の振とう条件は3.3.3に記載した。

^{b)} 昇温気化注入法

表3-5a. 13機関が分析した各油脂試料中の遊離型相対濃度と統計データ

機関コード		遊離型相当濃度 (mg/kg)					
		No.1 なたね高含有			No.2 パーム固体脂		
		3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
A	1	3.28	3.94	5.11	3.28	1.82	2.13
	2	3.46	4.01	5.10	3.23	1.87	2.19
B	1	3.28	3.77	4.99	3.31	1.83	2.13
	2	3.43	3.84	5.07	3.42	1.80	2.11
C	1	1.89*	3.07	4.75	1.34	1.35*	1.81
	2	2.52*	3.35	4.65	2.00	1.59*	1.78
D	1	3.96	4.04	5.05	3.04	1.91	2.18
	2	3.78	4.05	5.39	2.91	1.88	2.21
E	1	3.56	4.10	4.70	3.04	1.88	2.00
	2	3.57	4.28	4.77	3.35	1.97	1.87
F	1	3.42	3.85	5.34	2.70	1.80	2.04
	2	3.50	4.02	5.63	2.63	1.78	2.20
G	1	3.63	4.09	5.29	3.64	2.08	2.29
	2	3.80	3.99	5.39	3.93	2.10	2.36
H	1	3.51	3.77	4.94	3.15	1.74	1.95
	2	3.51	3.73	4.92	3.18	1.74	1.95
I	1	3.55	3.91	4.99	3.25	1.80	2.06
	2	3.50	3.90	4.90	3.24	1.85	2.03
J	1	3.54*	3.69	4.79	3.36	2.38*	2.90*
	2	3.02*	3.59	5.30	2.45	1.64*	2.12*
K	1	3.53	3.77	4.89	3.06	1.70	1.85
	2	3.53	3.90	4.65	3.18	1.69	1.83
L	1	3.14	3.54	4.99	3.73	1.69	2.04
	2	3.26	3.66	5.43	3.41	1.75	2.20
M	1	3.12	4.78	5.01	2.54	2.18	2.05
	2	3.13	4.74	4.84	2.87	2.24	2.05
外れ値を排除後の機関数		11	13	13	13	11	12
平均値 (mg/kg)		3.48	3.90	5.03	3.05	1.87	2.06
併行精度							
標準偏差 (SD _f)		0.08	0.09	0.17	0.26	0.03	0.06
相対標準偏差 (RSD _f)		2.31	2.32	3.44	8.38	1.77	2.77
空間再現精度							
標準偏差 (SD _R)		0.22	0.36	0.27	0.55	0.16	0.16
相対標準偏差 (RSD _R)		6.35	9.31	5.28	18.03	8.55	7.65
Horwitz ratio		0.48	0.71	0.42	1.33	0.59	0.53

* Cochran検定によって外れ値と判定

表3-5b. 13機関が分析した各油脂試料中の遊離型相対濃度と統計データ

機関コード		遊離型相当濃度 (mg/kg)					
		No.3 パーム液体油			No.4 なたね高含有		
		3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
A	1	2.92	1.80	2.25	3.17	3.76	5.05
	2	3.04	1.82	2.31	3.00	3.67	4.85
B	1	3.12	1.79	2.33	3.41	3.71	4.99
	2	2.97	1.66	2.30	3.47	3.71	5.05
C	1	1.91*	1.44*	1.99	2.34	3.13	4.92
	2	3.34*	1.79*	1.86	2.19	3.27	4.78
D	1	3.46	1.90	2.58	3.52	3.95	5.13
	2	3.46	1.81	2.49	3.57	3.98	5.31
E	1	3.30	1.94	2.04	3.59	4.29	4.64
	2	3.24	1.93	2.07	3.56	4.18	4.68
F	1	2.90	1.70	2.24	3.31	3.96	4.97
	2	3.28	1.84	2.35	3.36	3.89	5.12
G	1	3.53	1.96	2.45	3.70	4.00	5.32
	2	3.37	1.97	2.40	3.87	4.10	5.39
H	1	3.04	1.64	2.12	3.46	3.73	5.06
	2	3.16	1.68	2.22	3.47	3.79	5.06
I	1	3.17	1.75	2.25	3.45	3.87	4.89
	2	3.19	1.75	2.21	3.58	3.80	4.96
J	1	3.21*	1.76*	1.91*	3.51	3.72	4.82
	2	2.39*	1.28*	1.58*	3.57	3.76	4.41
K	1	3.25	1.66	2.21	3.55	3.76	4.71
	2	3.33	1.70	2.24	3.40	3.74	4.60
L	1	3.27	1.38	2.29	3.44	3.46	5.64
	2	3.45	1.46	2.29	3.45	3.22	5.62
M	1	2.98	2.20	2.29	3.14	4.60	4.95
	2	2.98	2.27	2.27	2.83	4.44	4.89
外れ値を排除後の機関数		11	11	12	13	13	13
平均値 (mg/kg)		3.20	1.80	2.25	3.34	3.83	4.99
併行精度							
標準偏差 (SD _f)		0.11	0.05	0.05	0.09	0.08	0.11
相対標準偏差 (RSD _f)		3.42	2.93	2.21	2.79	2.01	2.20
室間再現精度							
標準偏差 (SD _R)		0.19	0.21	0.16	0.39	0.35	0.30
相対標準偏差 (RSD _R)		6.03	11.66	7.18	11.68	9.02	5.98
Horwitz ratio		0.45	0.80	0.51	0.88	0.69	0.48

* Cochran検定によって外れ値と判定

表3-5c. 13機関が分析した各油脂試料中の遊離型相対濃度と統計データ

機関コード		遊離型相当濃度 (mg/kg)					
		No.5 なたね低含有			No.6 米ぬか油		
		3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
A	1	0.57	0.67	0.90	1.36	1.42	3.69
	2	0.56	0.68	0.91	1.34	1.44	3.86
B	1	0.58	0.57	0.89	1.38	1.38	3.85
	2	0.56	0.57	0.91	1.32	1.32	3.88
C	1	0.24*	0.46*	0.77	0.82*	1.22	3.50
	2	0.94*	0.70*	0.75	1.80*	1.36	3.54
D	1	0.63	0.65	1.01	1.29	1.36	3.86
	2	0.61	0.66	0.97	1.42	1.44	3.98
E	1	0.58	0.66	0.83	1.36	1.52	3.53
	2	0.55	0.58	0.78	1.34	1.56	3.29
F	1	0.56	0.67	0.74*	1.36	1.37	3.71
	2	0.55	0.68	0.91*	1.32	1.36	3.83
G	1	0.83	0.75	0.93	1.40	1.27	3.45
	2	0.84	0.73	0.96	1.58	1.36	3.70
H	1	0.62	0.61	0.84	1.36	1.32	3.83
	2	0.62	0.59	0.83	1.36	1.29	3.59
I	1	0.59	0.59	0.83	1.33	1.30	3.73
	2	0.58	0.57	0.83	1.35	1.31	3.69
J	1	0.60*	0.57	0.81*	1.40	1.25	3.34
	2	1.48*	0.61	0.95*	1.38	1.27	3.42
K	1	0.56	0.56	0.85	1.36	1.27	3.69
	2	0.54	0.57	0.85	1.35	1.30	3.51
L	1	0.76	0.56	0.89	1.61	1.24	3.56
	2	0.81	0.51	0.86	1.77	1.36	3.86
M	1	0.45	0.62	0.86	1.23	1.62	3.76
	2	0.46	0.63	0.85	1.22	1.58	3.77
外れ値を排除後の機関数		11	12	11	12	13	13
平均値 (mg/kg)		0.61	0.62	0.87	1.38	1.37	3.67
併行精度							
標準偏差 (SD _f)		0.02	0.02	0.02	0.06	0.05	0.12
相対標準偏差 (RSD _f)		2.62	3.41	1.89	4.23	3.41	3.23
室間再現精度							
標準偏差 (SD _R)		0.11	0.06	0.07	0.12	0.11	0.18
相対標準偏差 (RSD _R)		18.03	9.73	7.49	8.74	7.93	5.02
Horwitz ratio		1.05	0.57	0.46	0.57	0.52	0.38

* Cochran検定によって外れ値と判定

室温で液体油である油脂試料 No.1, 3, 4, 5, 6の併行精度の相対標準偏差 (RSD_r) は、3-MCPDが4.2%未満、2-MCPDが3.4%未満、グリシドールが3.4%未満、室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) は3-MCPDが18.1%未満、2-MCPDが11.7%未満、グリシドールが7.5%未満であった。室温で固体脂である油脂試料 No.2の RSD_r は、3-MCPDが8.4%未満、2-MCPDが1.8%未満、グリシドールが2.8%未満、固体脂の RSD_R は、3-MCPDが18.1%未満、2-MCPDが8.6%未満、グリシドールが7.7%未満であった。

Horwitz ratios (HorRat値) は、化学分析の定量法の性能指標の1つとして、性能評価に用いられる^{59, 60)}。合同試験により得られた RSD_R とHorwitzの式から予測される RSD_R の比として表され、2以下であれば妥当とされる。本合同試験において、全油脂試料のHorwitz ratiosは、3-MCPDが1.33以下、2-MCPDが0.80以下、グリシドールが0.53以下であったため、妥当であると判断した。

本合同試験において、油脂試料No.2 パーム固体脂とNo.5 なたね低含有の3-MCPDの RSD_R が最も大きかった。油脂試料 No.5 なたね低含有において、他の油脂試料と比較して3-MCPDの RSD_R が大きくなった要因は、試料中の遊離型相当濃度が最も低含有であったためだと考える。表3-5cより、No.5 なたね低含有中の3-MCPD、2-MCPD、グリシドール遊離型相当濃度は、0.61~0.87 mg/kgであった。No.5の RSD_r は3-MCPDが2.6%未満、2-MCPDが3.4%未満、グリシドールが1.9%未満であり、十分小さい値であった。 RSD_R は3-MCPDが18.1%未満、2-MCPDが9.7%未満、グリシドールが7.5%未満であった。2-MCPDとグリシドールと比較して3-MCPDの RSD_R が大きかったが、GCクロマトグラム上で3-MCPD PBA誘導体化物 (m/z 147) の保持時間より前にキャピラリーカラム由来のピークが検出された機関もあり、低含有の油脂試料ではカラム由来のピークに大きく影響されたと推測した。No.5 なたね低含有のHorwitz ratiosは3-MCPDが1.05、2-MCPDが0.57、グリシドールが0.46と2以下であり、本分析法は低含有の食用油脂中の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの分析にも適していることが確認できた。

No.2 パーム固体脂は3-MCPDの RSD_R が18.0%であり、3-MCPD相当濃度が同程度であるNo.3 パーム液体油よりもやや大きい傾向が見られた。3-MCPDの分析値が特に低かった3機関 (C、F、M) では、パーム固体脂にイソオクタンを添加後に50℃未満で加

温を行っていた。“コーディネーターが分析したNo.2 パーム固体脂の3-MCPD分析値を100とした場合の相対値”と“油脂を溶解するための温度”の関係を図3-2に示す。

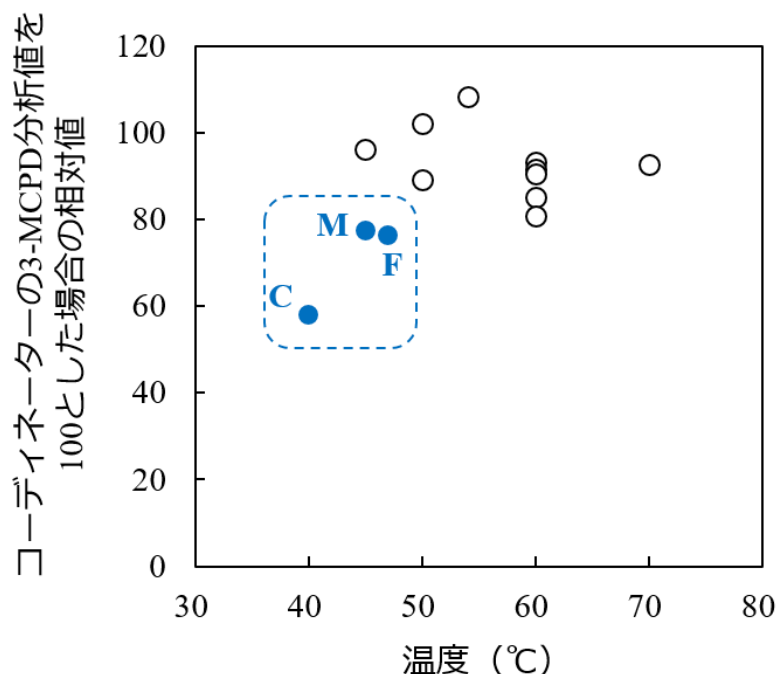


図3-2. 3-MCPD分析値への油脂溶解温度の影響。油脂試料は、No.2 パーム固体脂（上昇融点 50℃）。横軸：油脂溶解のための加温温度、縦軸：コーディネーターの3-MCPD分析値を100とした場合の相対値。

● 3-MCPD濃度の低かった3機関（C, M, F）、○ 他の10機関

油脂試料No.2 パーム固体脂の上昇融点である50℃よりも低い温度で加温した機関（図3-2：●）では、3-MCPDの相対値が低くなる傾向が見られた。一方、50℃以上で加温した機関では、3-MCPDの相対値は81～108であった。一方で、2-MCPD、グリシドールは加温温度の影響をほとんど受けていなかった（データ未記載）。そのため、上昇融点以下の温度では固体脂は完全に溶解せず、他の分析種よりも加水分解が遅い3-MCPD-Esの分解が完了しなかったと推測した。

以上の結果から、室温で固体脂を溶解するための加温温度は60℃以上または油脂の上昇融点よりも10℃高い温度と定めた。非水系でメタノリシスを行うAOCS Official

Method 3法に対し、水系で加水分解を行う本分析法では、当初、固体脂の分析が懸念された。しかし、加水分解前に適切な温度で油脂試料をイソオクタンに溶解することで固体脂にも適用できた。

非明示の同一試料であるNo.1とNo.4なたね高含有の分析値は、F検定のP値が0.19～0.62、T検定のP値が0.67～0.94であり、どちらも0.05よりも大きかった。さらに、No.1とNo.4の各繰り返し分析（ $n=2$ ）の1回目の分析値を組み合わせるとRSD_rを算出したところ、3-MCPDが3.5%、2-MCPDが2.0%、グリシドールが2.0%であった。これらの値は、表3-5a、表3-5bに示すNo.1とNO.4のRSD_rと同等であった。以上の結果から、反復性があると判断した。

2013年にAOCSが実施したOfficial Method 3法の合同試験において、遊離型相当濃度1～11 mg/kgのパームを油脂試料として用いた場合、RSD_rが3.5～9.9%、RSD_Rが6.4～31.8%であった⁶¹。本合同試験では、遊離型相当濃度 0.61～4.64 mg/kgの油脂試料を用いた場合、RSD_rが1.8～8.4%、RSD_Rが5.0～18.1%であったため、AOCSの合同試験と比べて同等以上の結果が得られたと判断した。

酵素的間接分析法の定量下限を確認するため、最も低濃度である検量線溶液を5試料調製 [2.2.6] し、GC-MSで分析した。定量下限はEFSA supporting publication 2015: EN-779⁶²を参考にして算出した。MCPD相当濃度の定量下限は、『面積比 (MCPD/MCPD- d_5) の標準偏差 ($n=5$) ÷ 内標準検量線の傾き × 添加した内標準の絶対量 ÷ 0.1 × 7.2』、グリシドール相当濃度の定量下限は、『面積比 (3-MBPD/3-MBPD- d_5) の標準偏差 ($n=5$) ÷ 内標準検量線の傾き × 添加した内標準の絶対量 ÷ 0.1 × 7.2 × グリシドールの分子量 74.08 ÷ 3-MBPDの分子量 154.99』から算出した。その結果、酵素的間接分析法の各遊離型相当濃度の定量下限は、3-MCPD 0.003 mg/kg、2-MCPD 0.002 mg/kg、グリシドール 0.002 mg/kgであった。

3.4 まとめ

食用油脂を対象とした試酵素的間接分析法の合同試験を実施し、室間再現精度を評価した。3-MCPD、2-MCPD、グリシドール相当濃度 0.61~4.64 mg/kgを含むパーム液体油、パーム固体脂、なたね油、米ぬか油を13機関が分析した。その結果、RSD_rは1.8~8.4%、RSD_Rは5.0~18.1%、Horwitz ratiosは1.3未満であった。これらは、AOCS Official Method 3法の合同試験における、RSD_r 3.5~9.9%、RSD_R 6.4~31.8%と比べて同等以上の結果であった。また、本分析法の定量下限は、3-MCPD 0.003 mg/kg、2-MCPD 0.002 mg/kg、グリシドール 0.002 mg/kgと十分小さかった。

本合同試験の結果より、酵素的間接分析法は、基準油脂分析試験法 基準法の必要条件の1つである『実用に供しうる室間再現精度、定量限界を有すること』を確認できた。そのため、試料範囲を植物油脂、動物油脂（魚油を除く）とした酵素的分析法は、日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法「2.4.14-2016 2/3-MCPD脂肪酸エステル、グリシドール脂肪酸エステル（間接分析-酵素法）」として、2016年6月に登録された⁶³⁻⁶⁵。

第4章. 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良

4.1 序論

酵素的間接分析法は、3-MCPD-Es、G-Esの加水分解に*C. rugosa*、または*C. cylindracea*由来リパーゼを用いることで、他法と比べてエステル型分析種から遊離型分析種への分解が迅速に完了する。一方で、*C. rugosa*、または*C. cylindracea*由来リパーゼはエイコサペンタン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）に対する分解特異性が低いことが報告されている^{66, 67)}。これらのリパーゼは、本分析法においても植物油脂、魚油を除く動物油脂に主に含まれる、炭素鎖長18以下の脂肪酸が結合した3-MCPD及びグリシドールの分解に適しているが、DHAが結合した3-MCPD及びグリシドールに対する分解特異性は低い。DHA濃縮魚油サプリメント3種を、酵素的間接分析法とAOCS Cd29aを用いて分析したところ、酵素的間接分析法の分析値が低くなる傾向が見られた（データ未記載）。そのため、基準油脂分析試験法基準法2.4.14.₂₀₁₆の適用範囲は、植物油脂及び魚油を除く動物油脂としている。魚油を主成分とする食品は、欧州や農林水産省の含有実態調査の対象試料としても挙げられており、魚油に適した分析法は必要であると考えられる。

本章では、DHA等が結合した3-MCPD、グリシドールに対する分解特異性の高いリパーゼの選定、そのリパーゼに適した加水分解条件を検討し、酵素的間接分析法を改良することで、DHAが結合した3-MCPD、グリシドールを含む魚油に適用できる改良法を開発することを目的とした。

4.2 方法

4.2.1 試料

いわし油、まぐろ油、DHA濃縮まぐろ油 3種、魚油サプリメント（魚油を主成分とする食品）7種は市販品を用いた。DHA濃縮まぐろ油 2種、EPA及びDHA濃縮いわし

油は、実験用に3-MCPD-Es、G-Esが高濃度となるよう調製したものを、地方独立行政法人 大阪産業技術研究所 森之宮センターの渡辺嘉博士に提供していただいた。添加回収実験に用いた3-MCPD-O/O、3-MCPDジドコサヘキサエノアート（3-MCPD-DHA/DHA）、G-O、グリシジルドコサヘキサエノアート（G-DHA）の各エステル型標準試薬は1,000 µg/mLとなるようトルエンに溶解した。

表4-1. 添加回収実験用のエステル型分析種の標準試薬

分析種	分子式	分子量
3-MCPD-DHA/DHA	C ₄₇ H ₆₇ ClO ₄	731.49
G-DHA	C ₂₅ H ₃₆ O ₃	384.55
3-MCPD-O/O	C ₃₉ H ₇₁ ClO ₄	639.43
G-O	C ₂₁ H ₃₈ O ₃	338.52

添加回収実験用の魚油試料は、蓋付き三角フラスコに、エステル型分析種の標準試薬を添加し、窒素ガスを吹き付けてトルエン（標準試薬の溶媒）を留去した。その後、三角フラスコに油脂を採取し、室温で1時間攪拌し、調製した。魚油サプリメントは、10 mL容スクリューキャップ付ガラス試験管に、ガラス製マイクロシリンジで1,000 µg/mL エステル型標準試薬を2 µLずつ添加し、窒素ガスを吹き付けてトルエンを留去した。次いで、食品を100～110 mg採取し、ボルテックスミキサーで攪拌して食品試料とした。

4.2.2 試薬

前章までの試薬に加えて、シクロヘキサン、2-プロパノール（和光純薬工業製）を用いた。3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA標準試薬は市販されていないため、地方独立行政法人 大阪産業技術研究所 森之宮センター（大阪、日本）の受託合成品を購入した。リパーゼ試薬として、リパーゼPSアマノSD、リパーゼAKは和光純薬工業製を用いた。なお、第4章まで和光純薬工業製のリパーゼAYSアマノは*C. rugosa*由来として販売されていたが、第4章の実験（2016年4月以降）から、由来の表記が*C. cylindracea*に変更さ

れた。以降、*C. cylindracea*と表記を統一する。その他のリパーゼ試薬は[第2章の2.2.2]に記載したものをを用いた。

4.2.3 試薬の調製

調製試薬4. 70% (w/v) 臭化ナトリウム (NaBr) 水溶液：100 mLを調製する場合は、NaBr 70 gを超純水75 mLに溶解した。次いで、1 mMクエン酸水溶液と1 mMリン酸水素二ナトリウム水溶液の双方を加えてpHを5.0~5.5に調整後、超純水を加えて100 mLとした。蓋付ガラス製容器に入れ、室温で保存した。

調製試薬5. クエン酸-リン酸水素二ナトリウム水溶液：100 mmol/L クエン酸水溶液及び200 mmol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液を混合し、pH 5.0~5.5の水溶液を調製した。

調製試薬6. 250 U/mLリパーゼ含有NaBr水溶液：油脂試料10を分析する場合、*Burkholderia cepacia*由来リパーゼを10,000 Uとなるようにクエン酸-リン酸水素二ナトリウム水溶液 [調製試薬5] 40 mLに加えた。マグネチックスタラーを用いて、穏やかに攪拌して溶解した。

4.2.4 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法

油脂試料100~110 mgを10 mL容スクリーキャップ付ガラス試験管に採取した。イソオクタン0.5 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌して油脂試料を溶解した。試験管に250 U/mL *Burkholderia cepacia*由来リパーゼ含有クエン酸-リン酸水素二ナトリウム水溶液 [調製試薬6] を3 mL加えて蓋を閉め、高速振とう機を用いて室温 (25℃) で30分間振とうした。振とう後、70%NaBr水溶液 [調製試薬4] を1 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。遠心分離機で3,000 rpm、10秒間遠心分離し、試験管を80℃に調節した恒温水層で10分間加温した。加温後は、[第2章の2.2.5 内標準添加、ヘキサン洗浄] 以降の工程に従った。

図4-1にフロー図を示す。

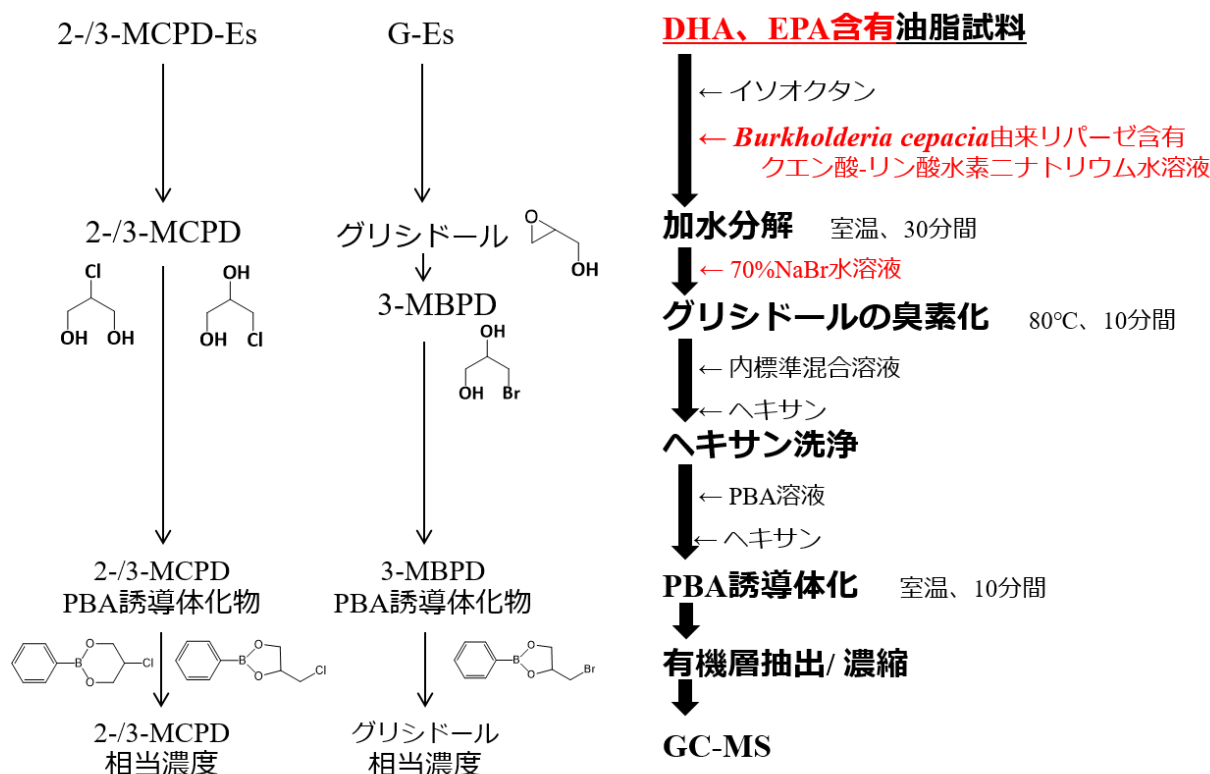


図4-1. 魚油を対象とした酵素的分析法の改良法のフロー。赤字は [2.2.5 酵素的間接分析法] からの変更点。

4.3 結果と考察

4.3.1 リパーゼの選定

DHA結合3-MCPDとグリシドールの加水分解に適したリパーゼを選定するため、*C. cylindracea*由来リパーゼを含めた7種のリパーゼ試薬を用いて、3-MCPD-DHA/DHAとG-DHAをエステル型相当濃度 各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を油脂試料とし、添加回収実験を行った。加水分解に用いる反応水溶液中のリパーゼの酵素量は90 U/mLまたは450 U/mLとし、それ以外の条件は [第2章の2.2.5 酵素的間接分析法] に従った。

表4-2. 3-MCPD-DHA/DHA、G-DHAを各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油からの3-MCPD、グリシドールの回収率。加水分解に用いるリパーゼの種類、酵素量以外の条件は [2.2.5 酵素的間接分析法] に従った。

リパーゼの由来	回収率 (%)			
	90 U/mL ^{a)}		450 U/mL ^{a)}	
	3-MCPD	グリシドール	3-MCPD	グリシドール
<i>Candida cylindracea</i> ^{b)}	3.6, 0.2	10.7, 19.5	0.2, 2.4	14.1, 14.2
<i>Burkholderia cepacia</i>	44.1, 45.4	91.4, 96.9	70.3, 65.2	96.7, 100.2
<i>Candida antarctica</i>	29.3, 27.5	101.7, 101.8	39.8, 40.6	101.4, 100.4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25.6, 14.6	91.1, 88.8	30.5, 31.8	88.6, 94.9
<i>Penicillium camembertii</i>	11.1, 8.6	77.5, 71.2	13.4, 8.0	70.6, 55.9
<i>Aspergillus niger</i>	5.4, 0.8	37.9, 18.5	7.5, 7.4	31.9, 33.1
<i>Rhizopus oryzae</i>	5.6, 2.9	24.2, 26.4	11.0, 7.9	46.8, 46.3

a) 30% NaBr水溶液中の酵素量

b) 第3章までは、*Candida rugosa*と表記

表4-2より、酵素的間接分析法で用いる*Candida cylindracea*由来リパーゼは、他のリパーゼと比較して、3-MCPDとグリシドールの回収率が最も低かった。*Burkholderia cepacia*、*Candida antarctica*、*Pseudomonas fluorescens*由来リパーゼを用いた場合、グリシドールの回収率は良好であったことから、これらのリパーゼはG-DHAを加水分解できることが示された。一方、3-MCPDの回収率は、*B. cepacia*由来リパーゼを用いた場合に最も高かった。これらの結果より、DHA結合3-MCPD、グリシドールの加水分解には*B. cepacia*由来リパーゼが適していると考え、以降の検討には*B. cepacia*由来リパーゼを用いた。

4.3.2 加水分解条件の改良

3-MCPD-DHA/DHAに対する*B. cepacia*由来リパーゼの加水分解効率を向上させるため、現行の酵素的間接分析法の加水分解条件が*B. cepacia*由来リパーゼの加水分解効率に与える影響を確認した。

4.3.2.1 油脂溶解溶媒の種類、添加量

初めに、油脂溶解溶媒の種類による影響を確認するため、3-MCPD-DHA/DHA及びG-DHAをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を油脂試料とし、添加回収実験を行った。各溶媒の添加量は0.2 mLとした。450 U/mL *B. cepacia*由来リパーゼ含有30%NaBr水溶液 3 mLを加えて、室温 (25℃)、30分間振とうし、加水分解した。リパーゼの種類、酵素量、油脂溶解溶媒以外の条件は [2.2.5 酵素的間接分析法] に従った。現行の酵素的間接分析法の油脂溶解溶媒はイソオクタン 0.2~0.5 mLである。

表4-3. 3-MCPD、グリシドールの回収率への油脂溶解溶媒の影響。

3-MCPD-DHA/DHA、G-DHAを各20 mg/kgとなるよう添加した
いわし油を試料とした。各溶媒の添加量は0.2 mLとした。

溶媒	回収率 (%)	
	3-MCPD	グリシドール
イソオクタン	70.3, 65.2	96.7, 100.2
ヘキサン	52.8, 54.6	94.0, 92.7
<i>n</i> -ヘプタン	53.0, 57.4	96.2, 93.2
シクロヘキサン	56.5, 61.8	96.0, 94.5
2-プロパノール	nd	32.6, 32.5

nd: 不検出

各溶媒を0.2 mLとなるように添加した場合、3-MCPDの回収率が最も高くなった溶媒は、現行の酵素的間接分析法と同様のイソオクタンであった。グリシドールの回収率はイソオクタン、ヘキサン、*n*-ヘプタン、シクロヘキサンの添加では良好であった (表4-3)。各溶媒の添加量を0.2 mLから0.5~1 mLに変更して同様の実験を行ったが、3-MCPDの回収率はイソオクタンを添加した場合が最も高かった (データ未記載)。

続いて、3-MCPD-DHA/DHAとG-DHAをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるよう添加したいわし油 100 mg、450 U/mL *B. cepacia*由来リパーゼ含有30%NaBr水溶液 3 mL

に対して、イソオクタンの添加量を0、0.2、0.5、1、2、3 mLに変更し、イソオクタンの最適な添加量を検討した。

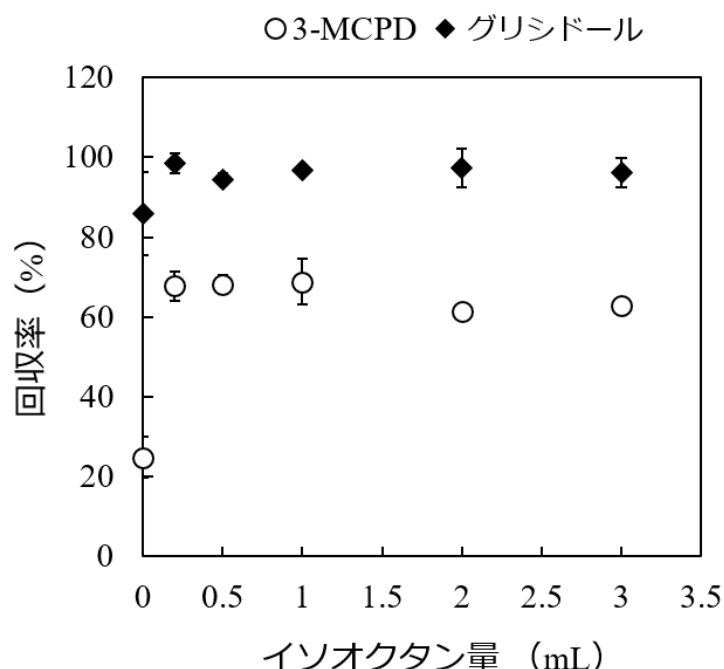


図4-2. 3-MCPD (O)、グリシドール (◆) の回収率へのイソオクタン添加量の影響。油脂試料は3-MCPD-DHA/DHA、G-DHAを各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を用いた。加水分解には、450 U/mL *B. cepacia*含有NaBr水溶液3 mLを用いた。n=2。

図4-2より、イソオクタンを0.2、0.5、1 mLとなるように添加した場合、3-MCPDの回収率（図4-2：O）はやや改善した。そのため、水溶液 3 mLに対するイソオクタンの添加量は0.5 mL（水溶液：イソオクタン=6:1）とした。

*C. cylindracea*由来リパーゼを用いて加水分解を行う酵素的間接分析法においても、油脂溶解溶媒としてイソオクタンを添加した場合、加水分解効率が向上する可能性が示唆された [第2章の2.3.2.2]。 *B. cepacia*由来リパーゼによる加水分解においても、イソオクタン無添加と比べ、イソオクタンを添加した試料の方が3-MCPD（図4-2：O）及びグリシドール（図4-2：◆）の回収率は向上した。そのため、イソオクタンの添加により、*B. cepacia*由来リパーゼの加水分解効率も向上できると推測した。

4.3.2.2 リパーゼ含有水溶液の水量

続いて、3-MCPD、グリシドールの回収率への*B. cepacia*由来リパーゼ含有30%NaBr水溶液の水量の影響を確認した。リパーゼ含有NaBr水溶液の量を2、3、4、5 mLの間で変更した。*B. cepacia*由来リパーゼは1,350 Uとなるように各水溶液に添加した。イソオクタンは、リパーゼ含有NaBr水溶液：イソオクタンが6:1の割合となるように添加した。現行の酵素的間接分析法のリパーゼ含有NaBr水溶液の水量は3 mLである。

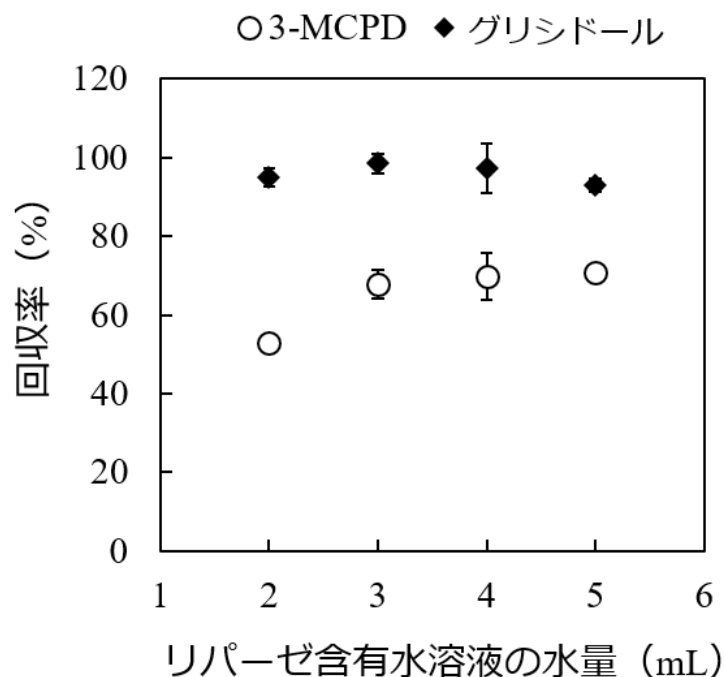


図4-3. 3-MCPD (○)、グリシドール (◆) の回収率への*B. cepacia*由来リパーゼ含有30% NaBr水溶液の水量の影響。3-MCPD-DHA/DHA、G-DHAを各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を試料とした。リパーゼ含有水溶液に対するイソオクタン添加量は1/6とした。 $n=2$ 。

検討した条件においてリパーゼ含有30%NaBr水溶液の水量が3、4、5 mLの場合に、3-MCPDの回収率（図4-3：○）は良好であった。各リパーゼ含有30%NaBr水溶液中の*B. cepacia*リパーゼの酵素量は1,350 Uと同じであるため、水量が2 mLの場合の3-MCPDの低回収率は、水溶液の水量の影響によるものと考えた。本分析法では振とうにより、

加水分解を進行させる。水量が少ない場合、油脂試料中の3-MCPD-Es、G-Esと水溶液中のリパーゼの接触する頻度が少なくなり、分解速度の遅い3-MCPD-Esの回収率が低くなったと推測した。これらの結果より、約100 mgの油脂試料に対して、油脂溶解溶媒としてイソオクタンを0.5 mL、リパーゼ含有NaBr水溶液を3 mL添加する条件を選定した。これらの条件は、酵素的間接分析法と同じである。

4.3.2.3 リパーゼ含有水溶液中のNaBr（共存物）の影響

最後に、リパーゼ含有水溶液中のNaBr濃度の影響を確認するため、NaBr濃度を0～30%（w/v）の間で変更し、加水分解を行った。現行の酵素的間接分析法のリパーゼ含有水溶液のNaBr濃度は30%（w/v）である。

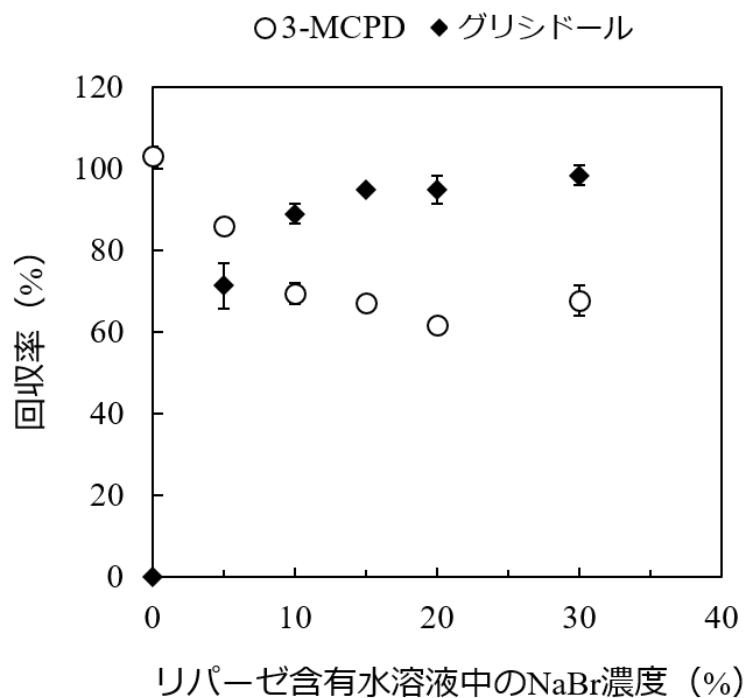


図4-4. 3-MCPD (O)、グリシドール (◆) の回収率への450 U/mL *B. cepacia*由来リパーゼを溶解した水溶液中のNaBr濃度の影響。3-MCPD-DHA/DHA、G-DHAを各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を試料とした。n=2。

リパーゼ含有水溶液中のNaBr濃度が低くなるにつれ、3-MCPDの回収率(図4-4:○)は向上した。そのため、NaBrの存在下では*B. cepacia*由来リパーゼの3-MCPD-Esに対する加水分解効率が抑制され、3-MCPDが低回収となったと推測した。一方、リパーゼ含有水溶液中のNaBr濃度が低くなるにつれ、グリシドールの回収率(図4-4:◆)は低下し、NaBr濃度が10% (w/v) 以下で回収率は90%を下回った。この結果より、グリシドールから3-MBPDへの臭素化には10% (w/v) 以上のNaBrが必要であることが示された。そのため、魚油を対象とした改良法の加水分解は、反応水溶液であるリパーゼ含有NaBr水溶液からNaBrを除去し、加水分解が完了後に10% (w/v) 以上となるようにNaBrを後添加する条件を選定した。

NaBrの他に、リパーゼ含有水溶液 (pH 5.0) に種々の塩を加えて添加回収実験を行った。各塩水溶液はすべて20% (w/v) となるよう超純水に溶解し、1 mM クエン酸水溶液と1 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液を用いてpH 5.0になるよう調製した。試料は3-MCPD-DHA/DHAを20 mg/kgとなるよう添加したいわし油を用いた。

3-MCPDの回収率は、臭化カリウム水溶液 87%、硫酸アンモニウム水溶液 73%、硫酸ナトリウム水溶液 66%、硫酸マグネシウム水溶液 47%であった。この結果より、加水分解時に高濃度の塩が存在することにより、*B. cepacia*由来リパーゼの加水分解効率は低下することが示唆された。

4.3.2.4 *B. cepacia*由来リパーゼの酵素量の選定

改良法では、加水分解時のリパーゼを溶解する水溶液として、30%NaBr水溶液の代わりに、クエン酸水溶液とリン酸水素二ナトリウム水溶液を用いてpH 5.0に調整した水溶液 [調製試薬5] を使用した。リパーゼ含有水溶液中の*B. cepacia*由来リパーゼの最適な酵素量を選定するため、“3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA”または“3-MCPD-O/OとG-O”を各20 mg/kgとなるよう添加したいわし油とDHA濃縮まぐろ油を用いて添加回収実験を行った。*B. cepacia*由来リパーゼの酵素量は90~300 U/mLに変更し、それ以外の条件は [4.2.4 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法] に従った (表4-4)。

表4-4. *B. cepacia*由来リパーゼの酵素量の選定。酵素量は90~300 U/mLに変更した。“3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA”または“3-MCPD-O/OとG-O”を各20 mg/kgとなるよう添加した油脂試料を用いて添加回収実験を行った。n=2。

油脂試料	添加標準	リパーゼ含有水溶液中の <i>B. cepacia</i> リパーゼの酵素量 (U/mL)					
		90	120	180	200	250	300
いわし油	3-MCPD-DHA/DHA	66.6, 82.1	84.4, 80.5	91.6, 99.8	103.9, 96.1	92.9, 104.1	96.1, 98.2
	3-MCPD-O/O	69.2, 79.7	77.7, 92.6	100.3, 99.4	96.0, 96.9	101.4, 104.7	96.2, 102.1
	G-DHA	97.4, 99.7	95.5, 99.6	100.8, 97.4	99.8, 98.8	99.3, 95.8	100.0, 99.8
	G-O	101.5, 95.7	95.9, 97.5	98.8, 96.9	100.2, 98.8	96.1, 98.4	99.6, 107.7
DHA濃縮まぐろ油	3-MCPD-DHA/DHA	78.1, 76.3	86.8, 85.3	90.0, 95.0	97.7, 97.5	102.1, 101.9	100.2, 100.1
	3-MCPD-O/O	68.4, 57.8	74.0, 71.8	103.2, 90.9	91.2, 95.3	97.9, 104.1	104.8, 98.0
	G-DHA	94.7, 95.9	96.6, 98.3	98.3, 97.5	98.5, 99.9	99.5, 101.3	100.7, 99.3
	G-O	97.8, 97.2	98.4, 97.0	94.5, 97.1	106.7, 109.1	96.3, 99.5	99.3, 105.5

*B. cepacia*由来リパーゼの酵素量が180 U/mL以上の場合、3-MCPDの回収率は90～105%と良好であった。検討した全ての条件において、グリシドールの回収率は95～109%と良好であった。これらの結果より、リパーゼ含有水溶液中の*B. cepacia*由来リパーゼの酵素量は安全域を加えて250 U/mLとした。

表4-5に酵素的間接分析法 [2.2.5] と魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法 [4.2.4] の加水分解条件を示す。

表4-5. 酵素的間接分析法 [2.2.5] と魚油を対象とした改良法 [4.2.4] の加水分解条件の比較。赤字は酵素的間接分析法からの変更点。

	酵素的間接分析法 [2.2.5]	魚油を対象とした改良法 [4.2.4]
リパーゼの由来	<i>Candida cylindracea</i> (<i>Candida rugosa</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i>
油脂溶解溶媒	イソオクタン 0.2～0.5 mL	イソオクタン 0.5 mL
水溶液の水量	3 mL	3 mL
加水分解溶液	リパーゼ含有30%NaBr水溶液	リパーゼ含有クエン酸- リン酸水素二ナトリウム水溶液
酵素量	90～180 U/mL	250 U/mL

4.3.3 改良した酵素的間接分析法

魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法 [4.2.4] の性能を評価するため、“3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA”または“3-MCPD-O/OとG-O”を各20 mg/kgとなるよう添加した油脂試料を用いて添加回収実験を行った（表4-6）。試料は、いわし油、まぐろ油、EPA及びDHA濃縮いわし油、DHA濃縮まぐろ油 3種、魚油サプリメント 5種を用いた。油脂試料中のEPA濃度範囲は3～15%、DHA濃度範囲は10～46%であった。

表4-6. 改良した酵素的間接分析法を用いた添加回収実験。“3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA”または“3-MCPD-O/OとG-O”を各20 mg/kgとなるよう添加した油脂試料を用いた。n=2。

油脂試料	回収率 (%)				
	DHA結合		オレイン酸結合		
	3-MCPD	グリシドール	3-MCPD	グリシドール	
いわし油	92.9, 100.7	99.8, 98.8	100.3, 99.4	98.8, 96.9	
まぐろ油	97.7, 97.5	108.0, 107.4	91.2, 95.3	106.7, 109.1	
EPA、DHA濃縮いわし油	94.4, 94.6	98.0, 107.3	98.9, 93.1	94.5, 102.2	
DHA濃縮まぐろ油	A	92.7, 97.3	99.5, 96.7	107.3, 106.9	94.8, 95.5
	B	108.6, 100.4	97.9, 97.1	102.1, 101.9	99.5, 101.3
	C	93.4, 100.6	90.9, 99.0	93.9, 97.2	99.3, 95.8
魚油サプリメント	A	103.4, 100.0	109.9, 97.1	104.1, 93.2	92.2, 96.1
	B	94.2, 102.2	94.0, 93.1	97.0, 101.8	104.1, 92.4
	C	96.8, 107.4	98.9, 105.8	103.4, 104.5	92.8, 92.9
	D	99.8, 92.3	99.6, 96.1	93.6, 97.9	98.5, 97.6
	E	101.3, 98.5	95.0, 107.5	92.4, 96.9	101.4, 105.4

表4-6より、3-MCPDの回収率は93~107%、グリシドールの回収率は93~108%と良好であった。そのため、改良した酵素的間接分析法はDHA結合3-MCPD及びグリシドールを含む種々の油脂試料に適用できると考えた。

4.3.4 改良した酵素的間接分析法とAOCS Cd29aの分析値比較

標準試薬無添加の油脂試料12種を、魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法 [4.2.4] とAOCS Cd29a [2.2.10] を用いて分析し、得られた分析値の比較を行った。油脂試料は、魚油サプリメント 7種、DHA濃縮まぐろ油 5種を用いた。分析値比較のための重み付きデミング回帰の結果を表4-7に示す。縦軸に改良した酵素的間接分析法、横軸にAOCS Cd29aで得られた分析値の平均をプロットした結果を図4-5に示す。

表4-7. 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法とAOCS Cd29を用いて分析した油脂試料12種の分析値に対する、重み付きデミング回帰結果。

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPD	切片	-0.045	0.035	-0.124	0.033
	傾き	1.055	0.045	0.956	1.155
2-MCPD	切片	0.016	0.009	-0.004	0.036
	傾き	0.961	0.044	0.863	1.059
グリシドール	切片	0.005	0.011	-0.021	0.030
	傾き	0.924	0.081	0.743	1.105

^{a)} 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した

傾きと切片の95%信頼区間は、それぞれ1、0を含むことから、改良した酵素的間接分析法の分析値とAOCS Cd29aの分析値は有意差がないことが示された。AOCS Cd29aは酸性条件下のメタノリシスを16時間行うことにより、結合する脂肪酸の種類に関係なく3-MCPD-Es、G-Esを分解する。魚油を対象とした酵素的間接分析法から得られた

分析値とAOCS cd29aから得られた分析値は同等であったことから、*B. cepacia*由来リパーゼを用いた加水分解は0.5時間以内に、魚油を含む試料中の3-MCPD-Es、G-Esを分解できることが示唆された。2-MCPDについては、DHAを結合する2-MCPD-Es標準試薬が市販されていないため、本研究において添加回収実験は未実施であるが、AOCS Cd29aの分析値と同等であったことから、改良した酵素的間接分析法を用いてDHA結合2-MCPDも分析できると考えている。

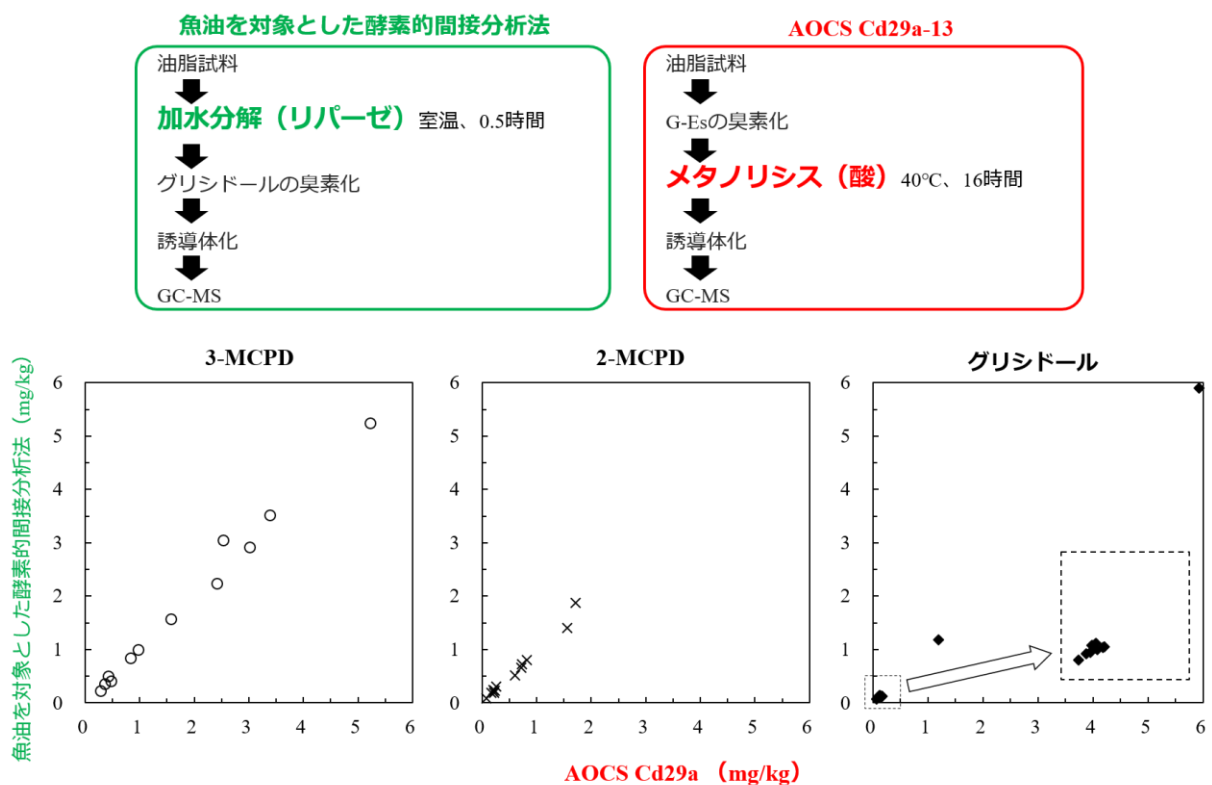


図4-5. 油脂試料12種を、魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法[4.2.4]とAOCS Cd29a [2.2.10] を用いて分析した時の分析値の平均値をプロットした。n=2。分析した油脂試料12種は、魚油サプリメント 7種、DHA濃縮まぐろ 5種。
縦軸：魚油を対象とした酵素的間接分析法から得られた分析値
横軸：AOCS Cd29aから得られた分析値。

用いた油脂試料中の濃度は、3-MCPD 0.23～5.25 mg/kg、2-MCPD 0.08～1.71 mg/kg、グリシドール 0.08～5.90 mg/kgであった。3-MCPD-Es、G-Esが高含有の2試料は、実験用に調製したDHA濃縮まぐろ油である。これら2種を除く試料中の3-MCPD相当濃度（3-MCPD-Es）、グリシドール相当濃度（G-Es）は2014年度の農林水産省の魚油を主成分とする食品中の3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査結果（3-MCPD：<0.08～4.00 mg/kg、グリシドール：<0.06～2.00 mg/kg）と比べて同等以下であった³⁰⁾。

4.4 まとめ

酵素的間接分析法で用いる*Candida cylindracea*由来リパーゼは、EPA、DHAの分解特異性が低いため、魚油のように高濃度にEPA、DHAを含む油脂は、酵素的間接分析法の適用範囲外であった。本章では、①加水分解に*C. cylindracea*由来リパーゼの代わりに*Burkholderia cepacia*由来リパーゼを用いること、②NaBrの添加を加水分解前から後に変更することにより、魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法を開発できた。“3-MCPD-DHA/DHAとG-DHA”または“3-MCPD-O/OとG-O”をエステル型相当濃度 各20 mg/kgとなるよう添加した魚油及び魚油サプリメントを油脂試料として添加回収実験を行ったところ、3-MCPDの回収率は91～109%、グリシドールの回収率は91～110%であり、良好であった。さらに、魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法とAOCS Cd29aの分析値を比較したところ、同等であることが確認できた。これらの結果より、魚油を対象とした改良法は、DHAを高濃度に含む油脂試料中の3-MCPD-Es、G-Esを分析できることが示された。

魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法は、2017年に日本油化学会 基準油脂分析試験法の推奨法（奨7-2017）として登録された⁶⁸⁾。

第5章 酵素的間接分析法の油脂含有食品への適用

5.1 序論

2010年以降、食用油脂を対象とした精度の高い分析法が整備され、国内外で含有実態調査、健康影響評価が実施されている。現在までに食用油脂中の3-MCPD-Es、G-Esに関する研究が進められ、生成機構、低減策について明らかになりつつある。一方、油脂を原料とする食品中の3-MCPD-Es、G-Esに関する研究報告は少なく、油脂含有食品を製造または加熱調理する際の3-MCPD-Es、G-Esの動態は不明である。油脂含有食品中の3-MCPD-Es、G-Es濃度の定量、製造・家庭調理における増減を把握するためには、分析法の適用範囲を食用油脂から油脂含有食品まで広げる必要がある。油脂含有食品は、水分や油脂以外の食品成分を含むことから、油脂を対象とした分析法では精製が不十分である可能性が高い。特に、AOCS Official Method 3法では、メタノリシスが水により妨害されるため、食品に適用するには試料の脱水が必須である。ErmacoraとHrncirikは、マーガリン、マヨネーズ等の高脂質食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを分析するための方法として、脂質抽出・脱水工程（AOCS Draft Method Cd30-15）を追加したAOCS Cd29aを報告した^{69, 70)}。EFSAは、食品中の脂質を高圧溶媒抽出装置により抽出した後、脱水し、AOCS Cd29aの改良法にて分析する方法を報告した⁶²⁾。一方で、酵素的間接分析法の加水分解は水系のリパーゼ含有NaBr水溶液中で行うため、油脂含有食品中の水分によって加水分解を干渉されないという仮説をたてた。その他の食品成分の影響については不明であるため、初めに、脂質抽出・脱水操作を追加せずに、食用油脂を対象とした酵素的間接分析法を用いて食品試料を分析し、適用できる食品群と適用範囲外の食品群を明らかにした。次いで、適用範囲外であった食品群に対しては、適用できなかった原因の究明及び改良を行うべき操作を特定し、分析法の改良を行った。

本章では、油脂含有食品の品質保証と製造、調理中の3-MCPD-Es、G-Esの動態解明のため、酵素的間接分析法の適用範囲を油脂含有食品にまで広げることを目的とした。

5.2 方法

5.2.1 食品試料

マヨネーズ 2種、植物油脂ファットスプレッド 2種、植物油脂マーガリン 6種、乳原料含有ファットスプレッド 2種、乳原料含有マーガリン 4種、バター 1種、調製粉乳 3種、フォローアップミルク 1種、大豆タンパク調製粉乳 1種、半固形状ドレッシング 1種、ルウ 2種、チョコレート 1種は市販品を用いた。

添加回収実験用の3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oの各エステル型標準試薬は1,000 µg/mLとなるようトルエンに溶解した。10 mL容スクリュウキャップ付ガラス試験管に、ガラス製マイクロシリンジで2 µLずつ添加し、窒素ガスを吹き付けてトルエンを留去した。次いで、食品を100～110 mg採取し、ボルテックスミキサーで攪拌して食品試料とした。

乳タンパク及び乳糖濃度の異なる試料 5種（乳タンパク濃度 3.5～35.2%, w/w、乳糖濃度 4.9～49.1%, w/w）は、EVOOに脱脂粉乳の比率を変えて混合し、3-MCPD-O/Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるように添加して調製した。同様に、乳脂濃度の異なる試料 7種（乳脂濃度 9～83%, w/w）は、EVOOにバターの比率を変えて混合し、3-MCPD-O/Oをエステル型相当濃度 20 mg/kgとなるように添加して調製した。

5.2.2 酵素的間接分析法

食用油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できる食品群を把握するため、エステル型標準試薬を添加した食品試料を、[第2章の2.2.5～2.2.8]に記載の方法に従って分析した。なお、水中油滴（O/W）型のマヨネーズはイソオクタンに溶解しないため、エタノール 0.5 mLを加えて溶解後、窒素ガスを吹き付けてエタノールを留去し、残渣を試料とした。加水分解の温度を変更した実験では、40℃に設定した恒温槽中で振とうを行った。

5.2.3 前処理法

調製粉乳のように、比較的脂質濃度が低く、炭水化物とタンパク濃度が高い食品試料には、下記の前処理を追加した。

食品試料100~110 mgを試験管に採取し、*tert*-ブチルメチルエーテル 2 mL、イソオクタン 1 mL、エタノール 1 mL、30% NaBr水溶液 [調製試薬1] 2 mLを加え、60°C、5分間加温した。加温後の試験管は冷却せずに、室温で10分間振とう後、パスツールピペットを用いて水層を除去した。沈殿物が存在する場合には、水層の除去ではなく、新たな試験管に有機層を移した。その後、有機層に対して超純水 3 mL加えて、ボルテックスミキサーで20秒間攪拌した。遠心分離機で3,000 rpm、1分間遠心分離後にパスツールピペットを用いて水層を除去した。この操作で、食品試料中の水溶性夾雑成分を水層とともに除去した。次いで、試験管中の有機層に対し、40°C加温下で窒素ガスを吹き付けて留去した。水分の残存は問題ないが、有機溶媒の残存は加水分解に影響を及ぼすため、有機溶媒は完全に留去した。得られた2-/3-MCPD-Es及びG-Esを含む残渣を、[第2章の2.2.5~2.2.8]に記載の方法に従って分析した。

5.2.4 AOCS Draft Method Cd30-15

他法との分析値の比較では、下記に示すCd30-15を追加したAOCS Cd29aを用いた。

食品中の脂質濃度に応じて、食品試料100~500 mg（油脂含量が100~110 mgとなるように）をガラス試験管に採取し、内標準トルエン溶液（40 µg/mL 3-MCPD-P/P-*d*₅, 50 µg/mL G-P-*d*₅）50 µLを加えた。*n*-ヘプタン/*tert*-ブチルメチルエーテル（1:2）混液 3 mL、超純水 2 mLを加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、60°Cで10分間加温した。次いで、試験管をボルテックスミキサーで攪拌後、超音波洗浄装置中で室温、10分間反応させた。3,500 rpm、10分間遠心分離後、パスツールピペットを用いて水層を除去した。その後、超純水 2 mL加えて、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌した。再度、超音波洗浄装置中で室温、10分間反応させた後、3,500 rpm、10分間遠心分離し、新たな試験管に有機層を移した。試験管中の有機層に対し、85°C、20分間窒素ガスを吹き付けて留去した。残渣は[第2章の2.2.10]のAOCS Cd29aに従って分析した。

5.3 結果と考察

5.3.1 高脂質食品への酵素的間接分析法の適用性確認

食用油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できる食品群を把握するため、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを添加した食品試料を用いて添加回収実験を行った。回収率の許容範囲は80～110%とした。分析法は、[第2章の2.2.5 酵素的間接分析法]に従った。結果を表5-1と表5-2に示す。

表5-1. エステル型分析種 3種を各20 mg/kgとなるよう添加した高脂質食品を、酵素的間接分析法 [2.2.5] を用いて分析した場合の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率。加水分解は室温（25℃）で行った。n=2。

食品試料		脂質濃度 (%) ^{a)}	回収率 (%)		
			3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
マヨネーズ	有塩 A	75	93.6, 92.6	103.0, 103.5	101.5, 102.4
	有塩 B	79	106.9, 100.4	96.6, 95.1	103.9, 106.5
植物油脂 ファットスプレッド	有塩 A	50	99.0, 95.6	106.5, 103.8	93.9, 98.8
	有塩 B	71	100.5, 100.9	101.8, 103.3	99.3, 100.3
植物油脂マーガリン	有塩 A	>80	108.4, 107.4	101.5, 100.6	105.4, 104.7
	無塩 B	>80	101.9, 106.9	100.9, 105.0	103.5, 104.4
	無塩 C	81	103.7, 108.0	103.6, 104.8	102.7, 106.7

^{a)} 製品の栄養成分表示から算出した

表5-1より、マヨネーズ、植物油脂ファットスプレッド、植物油脂マーガリンの各分析種の回収率は、3-MCPD 93～108%、2-MCPD 95～107%、グリシドール 94～107%と良好な結果であった。そのため、マヨネーズ、植物油脂ファットスプレッド、植物油脂マーガリンのような高脂質食品は酵素的間接分析法を用いて分析できることが示された。

表5-2. エステル型分析種 3種を各20 mg/kgとなるよう添加した乳原料を含む高脂質食品を、酵素的間接分析法 [2.2.5] を用いて分析した場合の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率。加水分解は、室温（25℃）（左）と40℃（右）で行った。n=2。

食品試料	脂質濃度 (%) ^{a)}	回収率 (%)						
		酵素的間接分析法			加水分解温度を40℃に変更した酵素的間接分析法			
		3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	
乳原料含有 ファットスプレッド	有塩 A	64	99.5, 101.2	103.6, 104.8	91.7, 103.6	105.1, 105.8	107.9, 103.2	102.4, 96.6
	有塩 B	61	86.6, 86.7	106.2, 104.6	100.6, 101.2	102.6, 103.0	100.6, 108.0	102.9, 99.8
乳原料含有マーガリン	有塩 A	>80	89.4, 87.7	98.4, 98.9	96.0, 95.7	94.6, 94.3	99.7, 99.4	103.6, 104.4
	無塩 B	>80	87.9, 88.7	99.4, 103.1	93.8, 100.3	92.2, 94.6	98.3, 102.3	99.0, 100.2
	無塩 C	>80	81.8, 86.0	108.0, 104.2	98.6, 98.5	98.8, 101.9	102.5, 107.9	100.9, 105.4
	無塩 D	>80	97.8, 98.0	109.5, 107.0	96.6, 99.7	102.7, 100.0	104.8, 103.8	101.3, 99.3

^{a)} 製品の栄養成分表示から算出した

また、NaCl存在下ではグリシドールが3-MCPDに塩素化される懸念がある。油脂試料であるパーム液体油に対してNaClを0.25～5% (w/w) となるように添加した場合でも、NaCl無添加のパーム液体油と比べて、3-MCPD、グリシドール濃度は同等であった(データ未記載)。表5-1においても、食品試料の塩の有無に関わらず良好な回収率であったため、食品中のNaClは分析には影響しないと考えた。

表5-2左より、乳原料含有ファットスプレッド、乳原料含有マーガリンの各遊離型分析種の回収率は、3-MCPD 82～101%、2-MCPD 99～110%、グリシドール 92～104%と良好な結果であった。しかし、検討に用いた乳原料含有6食品のうち4食品において、3-MCPDの回収率が80%台となった。乳原料を含まない食品試料中の3-MCPDの回収率(表5-1)、全食品試料の2-MCPD、グリシドールの回収率は90～110%の範囲内であったことから、乳原料中に3-MCPDを低回収率とする要因があると考えた。

5.3.2 加水分解温度の変更による乳脂を含む食品への適用

酵素的間接分析法を用いた高脂質含有食品の添加回収実験において、乳原料を含む食品の一部で3-MCPDの回収率は80%台とやや低回収となった。乳原料[乳タンパク、乳糖、乳脂]のうち、乳原料含有食品試料中の3-MCPDの低回収率の要因となっている成分を特定するため、乳タンパク及び乳糖の疑似マトリクスとして“脱脂粉乳”、乳脂の疑似マトリクスとして“バター”をエキストラヴァージンオリーブ油(EVOO)に異なる比率で混合し、3-MCPD-O/Oを20 mg/kgとなるよう添加した試料を用いて添加回収実験を行った。

初めに、乳タンパクと乳糖の影響を確認するため、混合比率の異なるEVOO・脱脂粉乳混合物(乳タンパク濃度 3.5～35.2%, w/w、乳糖濃度 4.9～49.1%, w/w)に3-MCPD-O/Oを添加した試料を用いて添加回収実験を行った(図5-1)。

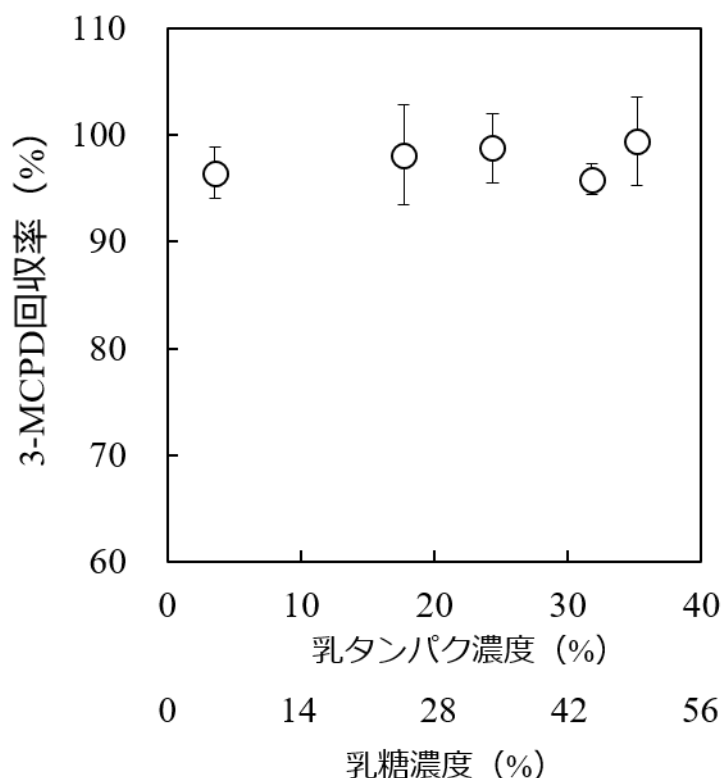


図5-1. 3-MCPD-O/Oを20 mg/kgとなるように添加したEVOO・脱脂粉乳混合物を、酵素的間接分析法を用いて分析した場合の3-MCPD回収率。加水分解は、室温（25℃）で行った。n=3。

図5-1より、乳タンパクと乳糖の含有濃度によらず、3-MCPDの回収率は良好であった。同様に、2-MCPD、グリシドールの回収率も良好であった（データ未記載）。

続いて、乳原料含有食品試料の3-MCPDの回収率への乳脂の影響を確認するため、乳脂比率の異なるEVOO・バター混合物（乳脂濃度 9～83%, w/w）に3-MCPD-O/Oを20 mg/kgとなるよう添加した試料を用いて添加回収実験を行った（図5-2）。

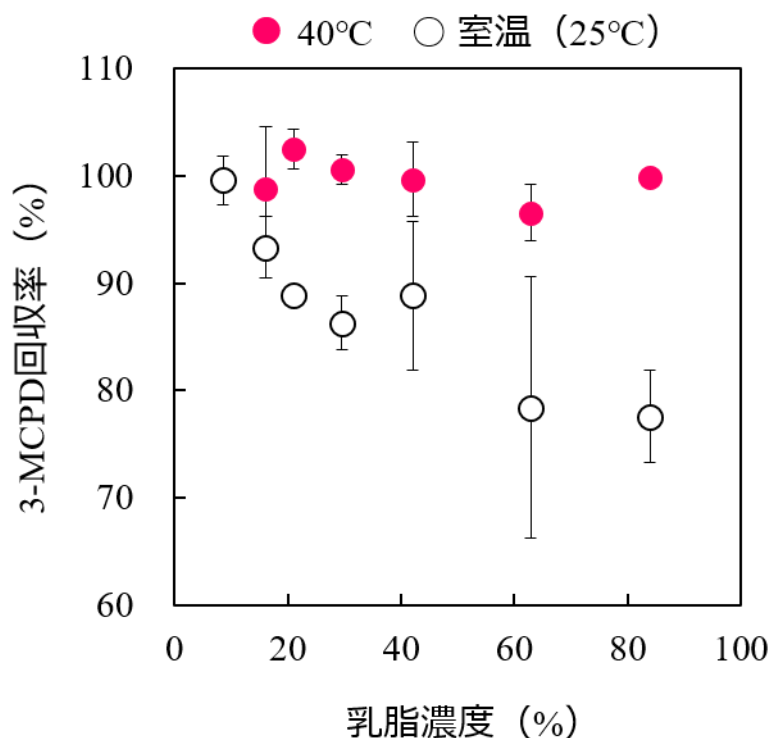


図5-2. 3-MCPD-O/Oを20 mg/kgとなるように添加した乳脂比率の異なるEVOO・バター混合物を、酵素的間接分析法を用いて分析した場合の3-MCPD回収率。加水分解の温度は、室温 (○) と40℃ (●) で行った。n=3。

図5-2より、酵素的間接分析法 [2.2.5] に従って、室温で加水分解を行ったところ、乳脂濃度が20%以上の試料では、3-MCPDの回収率 (○) は90%未満に低下した。なお、2-MCPDとグリシドールの回収率は96~106%であり、乳脂濃度の影響を受けなかった (データ未記載)。従って、3-MCPDの低回収率は、乳原料のうち乳脂が要因であることが示された。

本分析法では、加水分解・グリシドールの臭素化工程以降の操作は内標準で補正している。また、第2章の図2-13で示した通り、EVOOにエステル型相当20mg/kgとなる

ように添加した3-MCPD-O/O、2-MCPD-L/L、G-Oの加水分解に要する時間は、それぞれ15～20分、10～15分、5分以下であり、3-MCPDジエステルが最も長いことが分かっている。これらのことから、乳脂の存在下では*C. cylindracea*由来リパーゼによる加水分解能力が低下し、3-MCPD-Esのみ低回収になると仮説をたてた。そこで、加水分解温度を現行の室温から、*C. cylindracea*由来リパーゼの至適温度、かつ、乳脂の融点付近である40℃に変更して、再度添加回収実験を行った。その結果、乳脂を多く含む試料においても、3-MCPDの回収率は改善できた（図5-2：●）。

さらに、表5-2に示した乳原料含有食品においても、加水分解温度を40℃に変更して分析したところ、3-MCPD回収率は92～106%と良好な結果が得られた（表5-2右）。そのため、乳脂含有食品は加水分解温度を室温から40℃に変更するのみで、酵素的間接分析法を適用できることが示された。なお、加水分解の温度を40℃に変更せず、室温のままでも、①反応時間を60分間に延長する、②反応時間は30分間のままで、*C. cylindracea*の酵素量を2倍にすることでも3-MCPDの回収率は改善した（データ未記載）。以上の結果から、20%以上の乳脂の存在により、*C. cylindracea*由来リパーゼによる加水分解能力が低下するが、加水分解温度を40℃にする、等の加水分解能力を向上させるための条件により、改善できることが示された。

さらに、乳脂存在下における3-MCPD低回収率の要因として、乳脂中の短鎖脂肪酸結合アシルグリセロールによる、加水分解の競争阻害が生じているのではないかと仮説をたてた。乳脂中には、他の植物油脂及び動物油脂と異なり、中鎖・長鎖脂肪酸結合のアシルグリセロールの他に、短鎖脂肪酸結合のアシルグリセロールが含有する。短鎖脂肪酸結合油脂の疑似マトリクスとして“トリブチリン”をEVOOに異なる比率で混合して、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるよう添加した試料を用いて添加回収実験を行った（図5-3）。トリブチリンは、炭素鎖長4の脂肪酸であるブチル酸（酪酸）が3つ結合したTAGである。トリブチリンは和光純薬工業製の試薬を用いた。

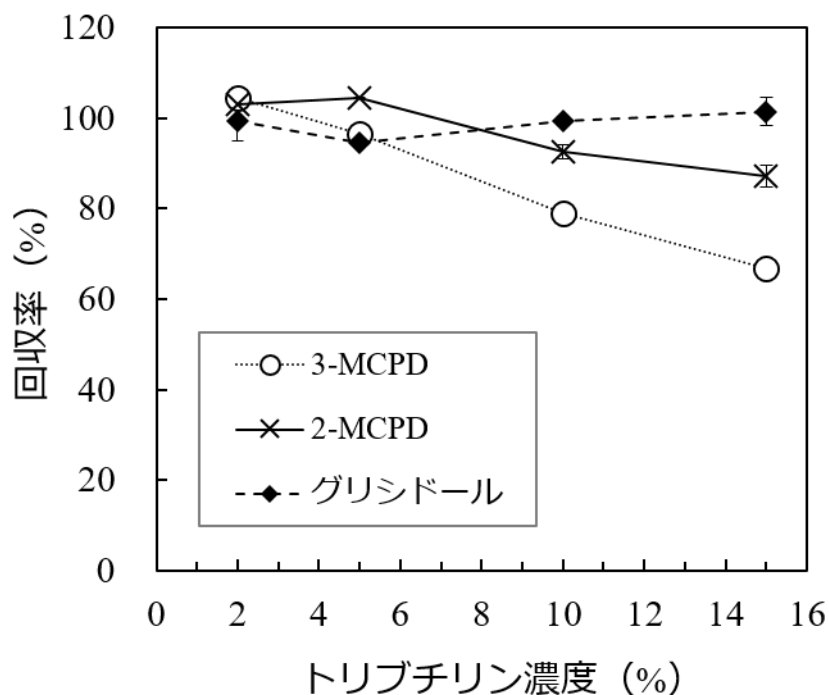


図5-3. 3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加したEVOO・トリブチリン混合物を、酵素的間接分析法を用いて分析した場合の3-MCPD (○)、2-MCPD (×)、グリシドール (◆) の回収率。n=3。

図5-3より、EVOO中のトリブチリン濃度を2～15% (w/w) に変更した試料において、2-MCPDの回収率 (×) は90～104%、グリシドールの回収率 (◆) は94～101%であり、トリブチリンの濃度によらず良好であった。一方、試料中のトリブチリン濃度が大きくなるにつれて、3-MCPDの回収率 (○) は低下した。トリブチリン濃度が10%以上の場合、3-MCPDの回収率は80%未満となった。そのため、乳脂存在下での3-MCPD低回収率の要因の1つとして、乳脂中の短鎖脂肪酸結合アシルグリセロールの存在が関与することが示された。加水分解時に短鎖脂肪酸結合アシルグリセロールが存在する場合、*C. cylindracea*由来リパーゼは長鎖結合アシルグリセロールよりも、炭素鎖長の短い、短・中鎖脂肪酸結合アシルグリセロールの分解を優先するのではないかと推測した。そのため、短・中鎖脂肪酸結合アシルグリセロールを含む試料の場合は、3つの改

善策 [①加水分解温度を室温から40℃に変更する、②加水分解時間を30分間から1時間にする、③加水分解溶液中の酵素量を2倍にする] のいずれかを行う必要がある [第2章の2.2.5]。なお、短・中鎖脂肪酸結合アシルグリセロールを含まない試料においても、これらの改善案を講じても問題はなかった。

5.3.3 高タンパク、高炭水化物含有食品への分析法の適用

次に、調製粉乳のような比較的 low 脂質、かつ、高タンパク、高炭水化物含有食品にも酵素的間接分析法を適用できるか確認するため、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-O を各20 mg/kgとなるように添加した調製粉乳、フォローアップミルク、大豆タンパク調製粉乳を用いて添加回収実験を行った (表5-3)。分析法は、[第2章の2.2.5 酵素的間接分析法] に従った。

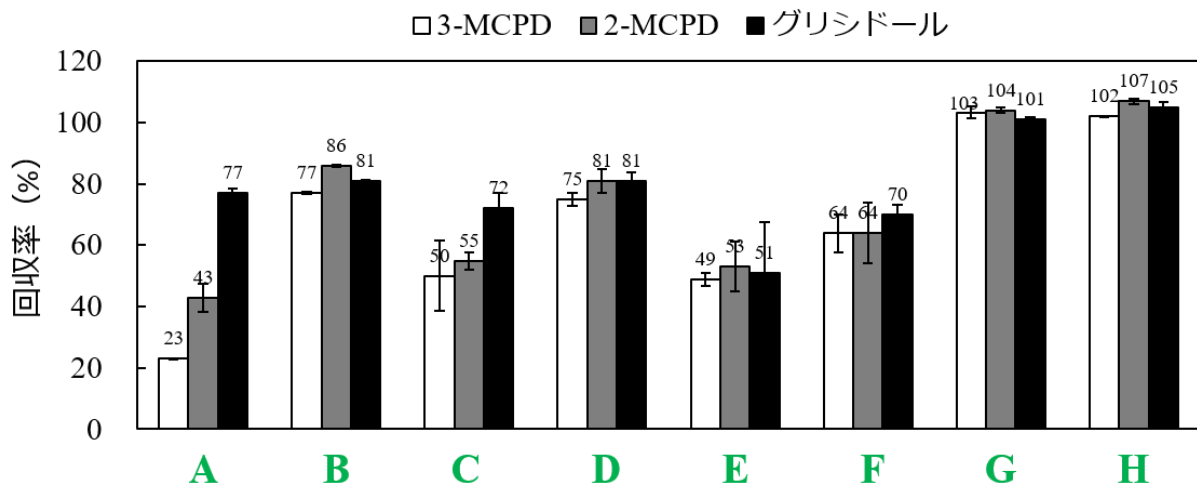
表5-3左より、フォローアップミルクと大豆タンパク調製粉乳においては、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率ともに良好であった。一方、調製粉乳3種では、3-MCPD 52~73%、グリシドール 63~103%と低回収率となる試料が存在した。低回収率であった調製粉乳においては、PBA誘導体化後の遊離型分析種の抽出時に、有機層と水層の明瞭な分離ができず、さらに、GCクロマトグラムでの m/z 147、150に分析を妨害するピークが検出された。高タンパク、高炭水化物含有食品の分析には酵素的間接分析法のみの操作では不十分であるため、精製操作を追加する必要があると考えた。そこで、液液分配により3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esを含む油脂を有機溶媒へ、食品中の水溶性夾雑成分を水層へ分離することを試みた。食品試料から3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esを抽出するのに適した有機溶媒を選定するため、[5.2.3 前処理法] に記載の抽出溶媒として、8種類の溶媒を用いて添加回収実験を行った (図5-4)。食品試料として、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加した調製粉乳Aを用いた。

表5-3. エステル型分析種3種を各20 mg/kgとなるよう添加した高タンパク・高炭水化物含有食品を、酵素的間接分析法（左）と前処理を追加した酵素的間接分析法（右）を用いて分析した場合の3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの回収率。
加水分解は、両分析法ともに室温で行った。n=2。

食品試料	濃度 (%) ^{a)}				回収率 (%)					
	脂質	炭水化物	タンパク	酵素的間接分析法			前処理を追加した酵素的間接分析法			
				3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	3-MCPD	2-MCPD	グリシドール	
調製粉乳	A	27	57	11	53.9, 58.1	90.6, 94.9	69.5, 63.2	107.3, 106.1	103.1, 104.8	99.8, 89.7
	B	28	56	12	61.2, 52.0	93.4, 84.5	101.9, 103.0	102.9, 101.1	95.4, 92.8	98.3, 101.1
	C	25	57	12	69.6, 73.4	90.1, 95.1	93.0, 93.4	102.7, 104.9	98.6, 95.1	102.0, 100.7
フォローアップミルク	18	61	14	90.4, 92.1	105.1, 104.3	100.2, 95.3	104.8, 100.3	99.6, 97.0	94.4, 95.2	
大豆タンパク調製粉乳	21	62	13	102.8, 101.4	100.3, 105.5	99.4, 99.0	100.3, 99.2	99.8, 101.9	97.5, 96.0	
半固形状ドレッシング	24	3	3	nt	nt	nt	103.7, 106.4	103.9, 103.9	97.7, 108.6	
シチュールウ	34	44	8	nt	nt	nt	106.0, 99.9	104.5, 94.3	97.1, 92.1	
カレールウ	35	45	6	nt	nt	nt	104.7, 97.7	101.4, 99.3	99.6, 97.0	
チョコレート	47	41	9	nt	nt	nt	96.8, 101.0	105.4, 107.4	107.9, 104.2	

nt: not tested

^{a)} 製品の栄養成分表示から、試料中の濃度を算出した



A	クロロホルム・メタノール (1:2) 混液	E	イソオクタン
B	ジエチルエーテル	F	<i>t</i> BME・イソオクタン (1:2) 混液
C	ヘキサン	G	<i>t</i> BME・イソオクタン (2:1) 混液
D	<i>tert</i> -ブチルメチルエーテル (<i>t</i> BME)	H	ヘキサン・2-プロパノール (3:2) 混液

図5-4. 3-MCPD (□)、2-MCPD (■)、グリシドール (■) の回収率への抽出溶媒の種類の影響。8種類の抽出溶媒 (A. クロロホルム・メタノール (1:2) 混液、B. ジエチルエーテル、C. ヘキサン、D. *tert*-ブチルメチルエーテル (*t*BME)、E. イソオクタン、F. *t*BME・イソオクタン (1:2) 混液、G. *t*BME・イソオクタン (2:1) 混液、H. ヘキサン・2-プロパノール (3:2) 混液) を検討に用いた。3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるよう添加した調製粉乳を食品試料とした。[5.2.3 前処理法] を追加した [2.2.5] 酵素的間接分析法を食品試料の分析に用いた。n=2。

図5-4より、*tert*-ブチルメチルエーテル・イソオクタン (2:1) 混液 (図5-4: G) またはヘキサン・2-プロパノール (3:2) 混液 (図5-4: H) を用いた場合に、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた。溶媒抽出後、窒素ガス吹き付けにより溶媒を留去するため、本研究においては、留去時間がより短かった*tert*-ブチルメチルエーテル・イソオクタン (2:1) 混液 (図5-4: G) を選定した。

また、本法においては抽出操作を振とう10分間（1回）としているが、AOCS Cd30-15においては超音波 10分間（2回）が用いられている。[5.2.3 前処理法]の抽出操作である振とう10分間（1回）を、超音波10分間（1回）または超音波20分間（1回）に変更し、3-MCPD-O/O、2-MCPD-P/P、G-Oを各20 mg/kgとなるように添加した調製粉乳A、調製粉乳Bを食品試料として添加回収実験を行った（表5-4）。

表5-4. 前処理法 [5.2.3] の抽出操作 (振とう、超音波) の違いによる3-MCPD、2-MCPD、グリシドール回収率への影響。n=2。

食品試料	抽出操作	回収率 (%)		
		3-MCPD	2-MCPD	グリシドール
調製粉乳 A	振とう 10分間	102, 101	106, 107	104, 107
	超音波 10分間	103, 101	101, 103	98, 99
	超音波 20分間	105, 101	103, 100	95, 94
調製粉乳 B	振とう 10分間	101, 105	91, 98	102, 99
	超音波 10分間	100, 94	91, 87	89, 87
	超音波 20分間	91, 92	92, 92	85, 85

表5-4より、調製粉乳Aはどの抽出操作を用いても良好な回収率であったが、調製粉乳Bにおいては超音波の時間が長くなるにつれ、グリシドールが低回収率となる傾向が見られた。そのため、抽出操作は、振とう10分間を選定した。なお、マーガリン、ファットスプレッドにおいては、抽出操作を超音波に変更しても回収率の低下は生じなかった（データ未記載）。

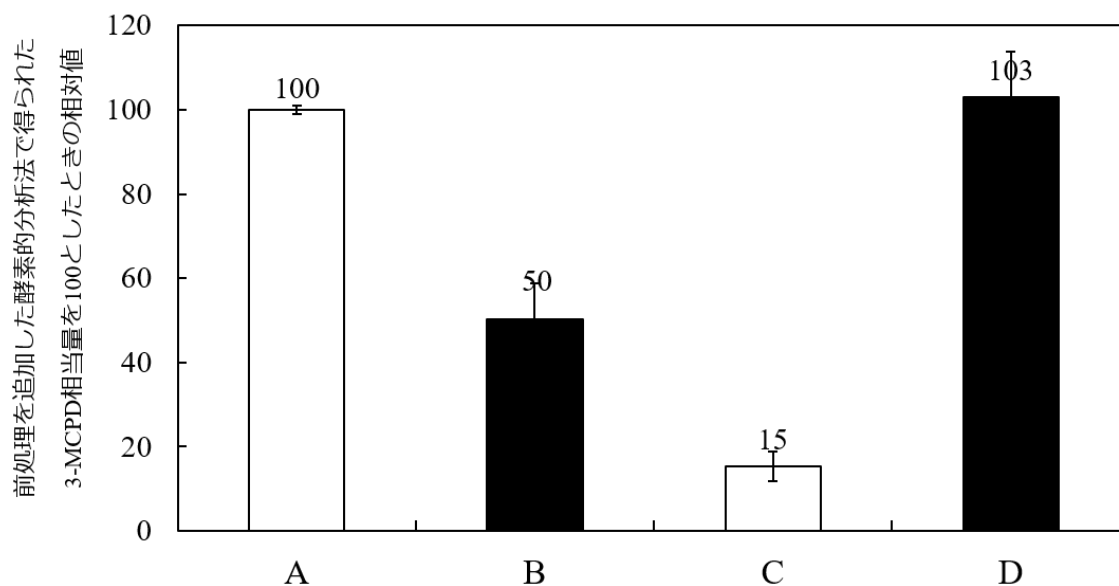
[5.2.3 前処理法] を追加した [2.5.5 酵素的間接分析法（加水分解は室温）] を用いて、調製粉乳3種、フォローアップミルク、大豆タンパク調製粉乳を分析したところ、3-MCPD 99～107%、2-MCPD 93～105%、グリシドール 90～109%と良好な回収率が得

られた(表5-3右)。前処理法を追加することにより、PBA誘導体化後の有機層と水層の分離も改善し、GCクロマトグラム上の m/z 147、150の妨害ピークも検出されなかったため、前処理法により、分析を妨害していた食品中の水溶性成分を除去できたことが示された。さらに、比較的low脂質、かつ高タンパク、高炭水化物の食品として、半固形状ドレッシング、ルウ 2種、チョコレートを用いて添加回収実験を行ったところ、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに良好な回収率が得られた(表5-3右)。以上の結果から、酵素的間接分析法は簡易な前処理法を追加するのみで、表5-3に示した食品群にも適用できた。

なお、前処理を追加した酵素的間接分析法を用いた添加回収実験においては、回収率100%を超える食品試料が多かった。添加回収率は、「 $(\text{標準試薬添加試料の分析種濃度}) - (\text{標準無添加試料の分析種濃度}) \div \text{標準添加濃度} \times 100$ 」から算出する[第2章の2.2.9]。本研究で食品試料として用いた製品中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esは定量下限付近の低濃度であったものも多く、標準無添加試料の分析値のばらつきがやや大きかったことが要因だと推測した。より低濃度の食品試料を分析するため、現在実施している農林水産省主催の平成29年度「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究」委託事業の研究課題である「油脂を用いた加熱調理が、食材中の3-MCPD-Es、G-Esの生成に及ぼす影響を把握するための分析法の開発」の中で、より広範囲の食品試料に適用し、感度の高い酵素的間接分析法の確立を目指して研究を進めている。

AOCS法では、食品試料はAOCS Cd30-15を追加したAOCS Cd29aで分析する。これらの分析法の基となった論文では、対象試料は、マヨネーズ、マーガリン、クリーム等であり、調製粉乳は対象外である。[5.2.3 前処理法]を追加した酵素的間接分析法と、[5.2.4 AOCS Cd30-15]を追加したAOCS Cd29aを用いて調製粉乳を分析し、分析値の比較を行った(図5-5)。本分析法で得られた3-MCPD相当濃度を100(図5-5:A)としたとき、AOCS法の分析値の相対値(図5-5:C)は15であった。本分析法の前処理法と

Cd30-15の大きな違いは、超音波の有無である。本分析法の前処理を、振とう10分間、1回から超音波10分間、2回に変更、Cd30-15を超音波10分間、2回から振とう10分間、1回に変更して同様の実験を行った。



前処理	5.2.3 前処理法		5.2.4 AOCS Cd30-15	
	抽出操作	振とう 10分間 1回	超音波 10分間 2回	超音波 10分間 2回
変更	なし	あり	なし	あり
分析法	酵素的間接分析法		AOCS Cd29a	

図5-5. 前処理を追加した酵素的間接分析法とAOCS Cd30-15を追加したAOCS Cd29aの抽出操作を変更した場合の3-MCPD分析値への影響。前処理を追加した酵素的間接分析法から得られた3-MCPD相当濃度を100としたときの相対値で比較した。□：通常の方法、■：抽出操作を改変した方法。n=2。

本分析法の抽出操作である振とう10分間 1回を超音波10分間 2回に変更した場合、3-MCPD相当濃度の相対値は50まで低下した（図5-5：B）。Cd30-15の超音波10分間 2回を振とう10分間 1回に変更した場合、3-MCPD相当濃度の相対値は103に改善した

(図5-5 : D)。表5-4と図5-5の結果より、AOCS Cd30-15を追加したAOCS Cd29aで調製粉乳が対象外であるのは、抽出操作の超音波が要因の一つであると推測する。

調製粉乳のように、他の食用油脂とともに魚油が配合された食品の分析には、[4.2.4 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法] と、[2.2.5 酵素的間接分析法] のどちらが適しているのかを確認した。試料は精製魚油が配合された調製粉乳7種を用いた。両分析法には、それぞれ [5.2.3 前処理法] を追加した。分析値比較のための重み付きデミング回帰の結果を表5-5に示す。

表5-5. 魚油を含む調製粉乳7種を、[5.2.3 前処理法] を追加した、[2.2.5 酵素的間接分析法] または [4.2.4 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法] を用いて分析した。n=2。得られた分析値の重み付きデミング回帰結果。

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPD	切片	0.001	0.017	-0.043	0.045
	傾き	1.033	0.097	0.785	1.282
2-MCPD	切片	-0.008	0.023	-0.067	0.051
	傾き	1.075	0.176	0.621	1.529
グリシドール	切片	0.005	0.003	-0.003	0.013
	傾き	0.870	0.109	0.591	1.150

^{a)} 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した

傾きと切片の95%信頼区間は、それぞれ1、0を含むことから、前処理を追加した魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法と、前処理を追加した酵素的間接分析法の分析値は有意差がないことが示された。魚油の配合量が少ない食品に対しては、どちらの分析法でも適用できると判断した。

5.3.4 他法との分析値の比較

最後に、食品試料においても、本分析法と他法の分析値に相関が得られることを確認した。AOCS法では調製粉乳等は対象外であるため、高脂質食品を用いて分析値を比較した。本分析法は、前処理法を追加していない酵素的間接分析法を用い、乳脂含有食品のみ加水分解を40℃に変更し、それ以外は室温で行った。他法はCd30-15[5.2.4]を追加したAOCS Cd 29a [第2章の2.2.10]を用いた。高脂質食品は、マヨネーズ 2種、植物油ファットスプレッド 2種、植物油マーガリン 4種、乳脂含有ファットスプレッド 2種、乳脂含有マーガリン 4種の計14種を試料として用いた。これらの食品試料中の各遊離型相当濃度は、3-MCPD 0.10～0.98 mg/kg、2-MCPD 0.05～0.41 mg/kg、グリシドール 0.15～0.59 mg/kgであった。分析値比較のための重み付きデミング回帰の結果を表5-6、縦軸に酵素的間接分析法で得られた遊離型相当濃度、横軸にCd30-15を追加したAOCS Cd29aで得られた遊離型相当濃度をプロットした結果を図5-6に示す。

表5-6. 酵素的間接分析法とCd30-15を追加したAOCS Cd29を用いて分析した高脂質食品試料14種の分析値に対する、重み付きデミング回帰結果。

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPD	切片	0.018	0.061	-0.115	0.150
	傾き	0.940	0.211	0.482	1.399
2-MCPD	切片	0.003	0.015	-0.030	0.036
	傾き	1.090	0.151	0.761	1.419
グリシドール	切片	0.015	0.017	-0.023	0.053
	傾き	0.919	0.082	0.741	1.097

a) 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した。

表5-6より、3-MCPD、2-MCPD、グリシドールともに、傾きと切片の95%信頼区間はそれぞれ1、0を含むことから、酵素的間接分析法の分析値とCd30-15を追加したAOCS Cd29aの分析値は同等であると判断した。一部食品において、グリシドール相当濃度が

酵素的間接分析法よりもAOCS Cd29aの方が高くなる傾向が見られた。AOCS Cd29aの改良法であるEFSA法において、酸性条件下におけるG-Esから3-MBPD-Esへの臭素化の際に、MAG、DAGから3-MBPD-Esが生成することが報告されている⁷¹⁾。酵素的間接分析法と比べて、Cd30-15を追加したAOCS Cd29aの方がグリシドール相当濃度の高かった食品試料については、MAG、DAGからの3-MBPD-Es生成が生じていた可能性があるかと推測した。

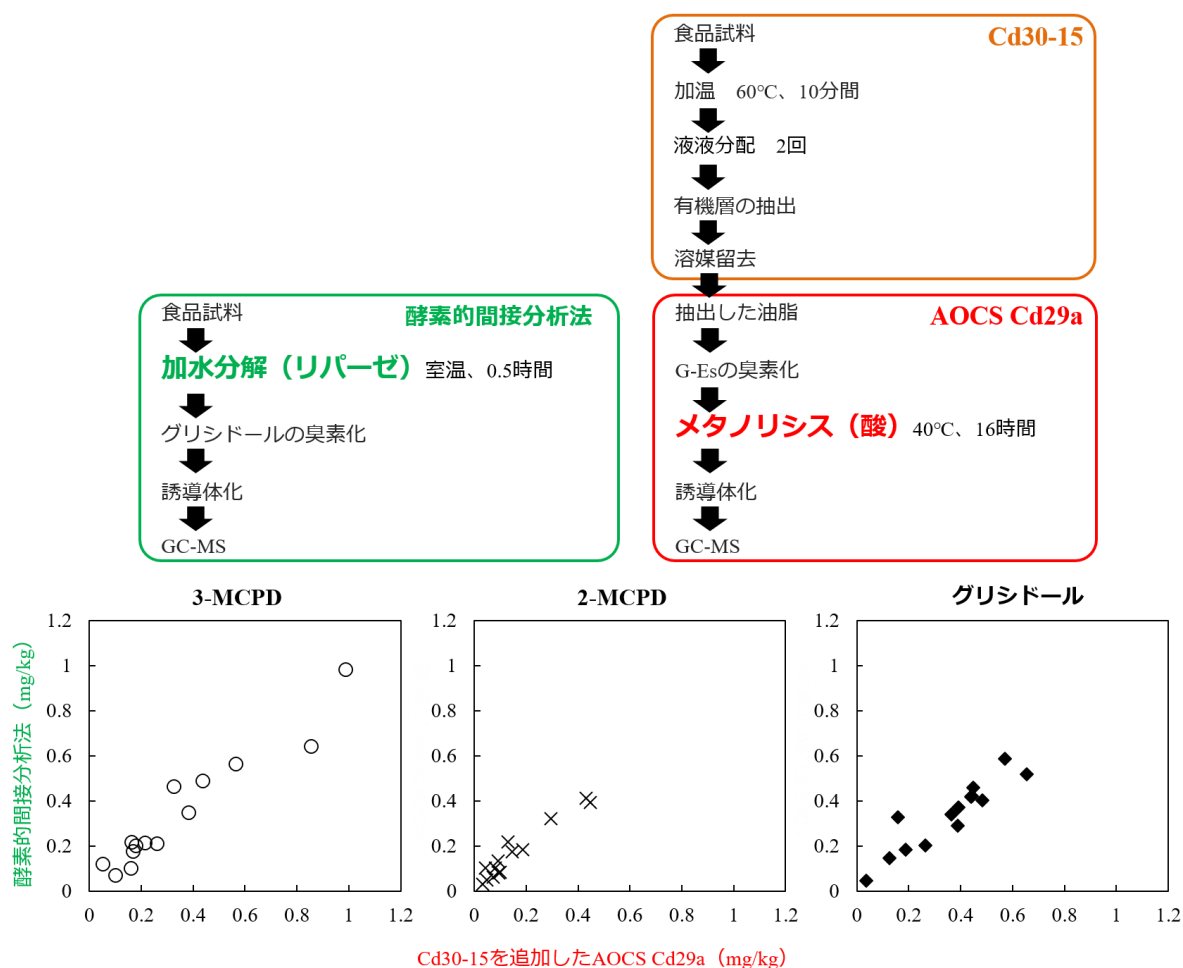


図5-6. 高脂質食品試料14種を、酵素的間接分析法とCd30-15を追加したAOCS Cd29aを用いて分析した時の分析値の平均をプロットした。n=2。分析した食品試料14種は、マヨネーズ2種、植物油ファットスプレッド2種、植物油マーガリン4種、乳脂含有ファットスプレッド2種、乳脂含有マーガリン4種。酵素的間接分析法は前処理を追加していない。加水分解は、乳脂を含む食品試料のみ40°Cで、それ以外の食品試料は室温で行った。

AOCS 3法は水分によって臭素化または加水分解が阻害されてしまうため、水分が存在する食品試料については、脂質抽出、脱水操作が必要である。一方、酵素的間接分析法は水系で加水分解を行うため、高脂質食品中に水分が存在していても、脂質抽出、脱水操作を必要とせず分析が可能である。食品試料を対象とする場合でも、本分析法は他法と比較して、迅速かつ簡便である。AOCS Cd30-15を追加したAOCS Cd29aは、複数機関による合同試験を実施し、性能評価を行っているが、適用範囲はマーガリン、マヨネーズ等の高脂質食品に限られる。農林水産省の平成24～25年度の3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査では、調製粉乳はレーゼ・ゴットリーブ法を用いて抽出した脂質をAOCS Cd29cを用いて分析し、添加回収実験では、3-MCPD 78～98%、グリシドール 66～90%と低回収率となったことが報告されている²⁹⁾。一般に用いられている脂質抽出法のレーゼ・ゴットリーブ法は煩雑であり、また、ソックスレー抽出法は長時間要する。欧州の含有実態調査では、EFSAの開発した方法が用いられた⁶²⁾。EFSA法では、高圧溶媒抽出(PLE)装置と、その抽出溶媒として*tert*-ブチルメチルエーテルを用いて食品中の脂質を抽出し、溶媒を留去後に、残渣をAOCS Cd29a改良法にて分析する。先にも述べたが、AOCS Cd29aの臭素化時にMAG、DAGから3-MBPD-Esが生成(グリシドール相当濃度の過大評価)することがわかっている。改善策として臭素化前に固相抽出を追加する方法が報告されている⁷¹⁾。さらに、EFSA法の高圧溶媒抽出条件は、調製粉乳中の3-MCPD-Es、G-Esの抽出は不十分であることから、抽出溶媒を石油エーテル/アセトン/イソヘキサン(2:1:2)に変更した方法が報告されている^{72, 73)}。

本分析法の前処理法は、簡便、かつ迅速に脂質中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを抽出することができる。さらに、マヨネーズやマーガリンのような高脂質食品では、前処理法を必要とせず、酵素的間接分析法をそのまま適用できるという大きな利点を有する。

5.4 まとめ

酵素的分析法の適用範囲を、食用油脂（動物油脂、植物油脂）から油脂含有食品へと広げることができた。マーガリン、ファットスプレッド、マヨネーズ等の高脂質食品は、前処理を追加せずに、油脂試料を対象とした酵素的間接分析法を用いて分析することができた。乳脂質を20%以上含む高脂質食品は、加水分解温度を室温から40℃に変更することで、酵素的間接分析法を用いて分析することができた。調製粉乳のように、比較的low脂質、かつ高タンパク、高炭水化物の食品は、酵素的間接分析法の精製では不十分であったため、簡易な液液抽出を前処理として追加し、水溶性の夾雑成分を除去した後、酵素的分析法で分析することができた。本法は、前処理を追加してもGC-MS検体の調製まで1日以内で完了するため、AOCS Cd30-15を追加したCd29aやEFSA法と比べて、迅速であり実用性の高い方法である。

総合討論

本研究の成果と課題

3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esは食用油脂の精製（主に脱臭）工程にて生成し、食用油脂中に含有することが報告された新規リスク物質である。リスク物質に対してリスク管理措置の必要性を検討するための基礎データを得るためには、精度の高い分析法が必須となる。これらエステル型分析種の存在が報告された当初、主に用いられていたドイツの公定法 DGF C-III 18 (09)は、3-MCPD-EsとG-Esを完全に区別して定量できない、メタノリシス中に分析種間の意図しない変換が生じる等の課題が報告されたため、各国で精度の高い分析法の開発が進められた。

本研究では、原料油脂や製品の安全保証のため、幅広い食用油脂（植物油脂、動物油脂）及び脂質含有食品中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esを精度良く、かつ迅速に定量できる分析法を開発することを目的として研究を行った（総-1）。

総-1. 本分析法と試料の適用範囲



エステル型分析種を各遊離型分析種へと分解し、定量する間接分析法を開発する上で、最も大きな課題は、分解中に生じる分析種間の意図しない変換を防ぐことであった。3-MCPD-EsとG-Esは類似構造であり、酸性条件かつ塩化物の存在下においては、G-Esから3-MCPD-Esや3-MCPDへ、アルカリ性条件下では3-MCPD-EsからG-Esやグリシドールへの変換が生じることが報告されていた。海外では、酸性やアルカリ性条件下において、分析種間の意図しない変換を抑制し、メタノリシスのみを進行させる手法を用いた分析法の開発が進められた。一方、本研究ではリパーゼによる加水分解に着目して新規分析法の開発を行った。

多くのリパーゼは最適pHが中性付近にあり、極端な酸性、アルカリ性のpHにせずとも分解が行え、pHの変化による分析種間の意図しない変換を抑制できると考えた。一方で、酸性、アルカリ性条件下のメタノリシスは脂肪酸の種類や結合位置等に特異性を示さず、分解を行うことができるが、リパーゼはその由来や反応条件によって、分解特異性を有するため、基質に適したリパーゼの種類、反応条件を検討する必要があった。第2章において、複数のリパーゼの中から、*Candida cylindracea*（または、*Candida rugosa*）由来リパーゼが炭素鎖長18以下の脂肪酸結合3-MCPD、2-MCPD、グリシドールの加水分解に適していることを明らかとした。さらに、*C. cylindracea*由来のリパーゼに適した加水分解条件を選定することで、食用油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの分解を短時間で完了させることができた。その結果、AOCS Official Method Cd29a（酸性条件下）、Cd29b（アルカリ性条件下）のメタノリシスが16時間要するのに対し、確立した酵素的間接分析法は加水分解が30分間以内に完了するという利点を有した。

酵素的間接分析法は、油脂の物性に関わらず、幅広い植物油脂、動物油脂（魚油を除く）に適用できたが、*C. cylindracea*由来リパーゼはEPA、DHAに対する分解特異性が低いという性質から、EPA、DHAを高濃度に含む魚油に適用することはできなかった。第4章では、酵素的間接分析法を魚油に適用できるように改良するため、炭素鎖長18以下の脂肪酸を結合した3-MCPD、グリシドール及びDHAを結合した3-MCPD、グリ

シドールの分解に適したリパーゼの種類と加水分解条件を検討した。検討に用いた7種のリパーゼの中で、*Burkholderia cepacia*由来のリパーゼがDHA結合3-MCPD、グリシドールの分解に適していることが示された。しかし、酵素的間接分析法の加水分解条件では、DHA結合3-MCPDに対する*B. cepacia*由来のリパーゼの分解能力は十分ではなかった。検証の結果、加水分解時の水溶液中に高濃度の塩が存在すると、*B. cepacia*の分解能力が低下することが明らかとなった。酵素的間接分析法の加水分解時の水溶液は*C. cylindracea*由来リパーゼ含有30% NaBr水溶液を用いるのに対し、改良法では、*B. cepacia*由来リパーゼ含有クエン酸-リン酸水素二ナトリウム水溶液を用いることとした。NaBrは加水分解後のグリシドールの臭素化に必須であるため、改良法では、加水分解後にNaBrを後添加した。酵素的間接分析法の一部を改良することにより、魚油に適した分析法を確立できた。

酵素的間接分析法の確立により、弊社の原料油脂の安全保証(油脂中の3-MCPD-Es、G-Es濃度の把握)を可能とした。酵素的間接分析法を、市場に流通する食用油脂や国内の含有実態調査に活用してもらうため、13機関による合同試験を実施し、本分析法の性能を評価した(第3章)。3-MCPD、2-MCPD、グリシドール相当濃度 0.61~4.64 mg/kgを含むパーム液体油、パーム固体脂、なたね油 3種、米ぬか油を合同試験用の油脂試料として用いた結果、RSD_rは1.8~8.4%、RSD_Rは5.0~18.1%であった。AOCSが実施したOfficial Method 3法の合同試験において、遊離型相当濃度 1~11 mg/kgのパーム油を油脂試料として用いた場合、RSD_rは3.5~9.9%、RSD_Rは6.4~31.8%であった。酵素的間接分析法の合同試験は、AOCSの合同試験と比べて同等以上の結果が得られた。これらの結果により、酵素的間接分析法は十分な室間再現精度を有し、実用に耐えうる分析法であることが認められ、2016年に日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法 2.4.14-2016として登録された。魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良法は、基準油脂分析試験法 奨7-2017(推奨法)として2017年に登録された。

加熱調理による3-MCPD-Es、G-Esの動態、油脂含有食品中の3-MCPD-Es、G-Es濃度を把握するためには、油脂含有食品に適した分析法が必要であった。食用油脂と比べ

て、油脂含有食品は様々な夾雑成分を含むため、脂質抽出工程や精製工程の追加が必要であると考えられた。特に、AOCS Official Method 3法では、メタノリシスは水の存在によって妨害されるため、食品からの脂質抽出、脱水工程は必須であった。一方、酵素的間接分析法は、加水分解を水系で行うため、食品中の水分による妨害は少ないだろうと仮説をたてた。酵素的間接分析法をそのまま適用できる食品範囲を確認したところ、マヨネーズ、マーガリン、ファットスプレッド等の高脂質食品は適用可能であった。調製粉乳のように高タンパク、高炭水化物食品は、酵素的間接分析法の精製では不十分であり、GCクロマトグラム上に食品の夾雑成分由来のピークが検出された。そこで、水溶性の食品成分を除去するための簡易な前処理（液液分配）を追加したところ、調製粉乳等の副原料の多い食品にも適用することができた。本研究においては、高タンパク、高炭水化物食品として、調製粉乳、ドレッシング、ルウ、チョコレートを用いたが、その他の幅広い食品群への適用は確認できていない。前処理を追加した酵素的間接分析法の適用範囲をさらに明確にすることが今後の課題である。

今後の展望

1) リパーゼによる加水分解手法

本研究では、加水分解にリパーゼを用いた。リパーゼは酸性、アルカリ性条件下のメタノリシスと異なり、基質に対して分解特異性を有するため、適したリパーゼの種類、反応条件を検討する必要がある。一般的には、機器分析に供する検液の精製（分解操作）には酸性、アルカリ性条件下のメタノリシス等が多く使用される。しかし、分析対象物に対して分解特異性が高いリパーゼ、かつ、加水分解に適した条件を見いだすことができれば、迅速に分析対象物を分解することができると思う。さらに、過剰な酸性、アルカリ性pHにする必要がないため、意図しない化学反応を抑制し、中和操作も不要であるため、作業効率が良い方法を開発できるだろう。今後、リパーゼによる加水分解を他の分析法にも応用していきたい。

2) 食品の品質管理への酵素的間接分析法の活用

本研究において、食用油脂及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを精度良く、かつ迅速に定量できる酵素的間接分析法を確立した。AOCS Official Method 3法と比べて、GC-MS検液調製が1日以内に完了し、かつ、各遊離型分析種を同時分析できるため、作業効率が良い方法であると考えられる。今後も、国内外で、食用油脂及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査、有害性の評価が進められるだろう。食品業界でも、自主的に、原料や製品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの含有濃度の把握、低減策開発の取り組みがされると推測する。酵素的間接分析法が、これら食品の品質管理に活用されることを期待する。

さらに、食用油脂中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの生成メカニズムや動態、低減策に関しては、多くの研究が進められ、明らかになりつつあるが、製造や家庭調理における油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態は未だ不明点が多い。今後は、食用油脂を対象とした酵素的間接分析法と、前処理を追加した酵素的間接分析法を用いて、製造前後での2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態を明らかにするための研究を行っていく。なお、農林水産省主催の平成29年度「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究」委託事業の研究課題「油脂を用いた加熱調理が、食材中の3-MCPD-Es、G-Esの生成に及ぼす影響を把握するための分析法の開発」を現在実施中である。この研究において、幅広い食品群に適した酵素的間接分析法の確立・性能評価の実施、及び、加熱調理中の3-MCPD-Es、G-Esの増減の有無、増加に影響する因子を明らかにしていきたい。

引用文献

- 1) J. Velišek, J. Davidek, J. Hajšlová, V. Kubelka, G. Janiček & B. Mánková, Z. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Lebensm. Unters Forsch.*, **167**, 241-244 (1978).
- 2) International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **101** (2012),
<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-010.pdf>
- 3) Scientific Committee on Food. Opinion on 3-mono-chloro-propane-1, 2-diol (3-MCPD), updating the SCF opinion of 1994 adopted on 30 May 2001 (2001),
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out91_en.pdf
- 4) CODEX, Code of Practice for the Reduction of 3-Monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) during the Production of Acid-Hydrolyzed Vegetable Protein (Acid-HVPs) and Products that Contain Acid- HVPs. CAC/RCP, **64** (2008).
- 5) 農林水産省, クロロプロパノール類に関する日本の取組 含有実態調査結果の概要,
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c_propanol/report.html
- 6) Svejková, B.; Novotný, O.; Divinová, V.; Réblová, Z.; Doležal, M.; Velišek, J. Esters of 3-Chloropropane-1, 2-Diol in Foodstuffs. *Czech J. Food Sci.*, **22**, 190-196 (2004).
- 7) Zelinková, Z.; Svejková, B.; Velišek, J.; Doležal, M. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils. *Food Addit. Contam.*, **23**, 1290-1298 (2006).
- 8) Divinová, V.; Svejková, B.; Doležal, M.; Velišek, J. Determination of Free and Bound 3-Chloropropane-1, 2-diol by Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection using Deuterated 3-Chloropropane-1, 2-diol as Internal Standard. *Czech J. Food Sci.*, **22**, 182-189 (2004).
- 9) 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).

- 10) Weißhaar, R.; Perz, R. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 158-165 (2010).
- 11) International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **77** (2000),
<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/mono77-19.pdf>
- 12) Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft: DGF Standard Methods C-III 18b. Ester-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD esters) and glycidol (glycidyl esters). Determination in fats and oils by GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, (2009).
- 13) Bakhiya, N.; Abraham, K.; Gürtler, R.; Appel, KE.; Lampen, A. Toxicological assessment of 3-chloropropane-1, 2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 509-521 (2011).
- 14) BfR Opinion No. 007/2009, 10 March (2009).
http://www.bfr.bund.de/cm/349/initial_evaluation_of_the_assessment_of_levels_of_glycidol_fatty_acid_esters.pdf
- 15) Svejková, B.; Doležal, M.; Velišek, J. Formation and Decomposition of 3-Chloropropane-1, 2-diol Esters in Model Simulating Processed Foods. *Czech J Food Sci.*, **22**, 190 (2004).
- 16) 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).
- 17) Zhang, X.; Gao, B.; Qin, F.; Shi, H.; Jiang, Y.; Xu, X.; Yu, L. Free Radical Mediated Formation of 3-Monochloropropanediol (3-MCPD) Fatty Acid Diesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 2548-2555 (2013).

- 18) Craft, B. D.; Chiodini, A.; Garst, J.; Granvogl, M. Fatty acid esters of monochloropropanediol (MCPD) and glycidol in refined edible oils. *Food Addit. Contam.*, **30**, 46-51 (2013).
- 19) 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).
- 20) Craft, B. D.; Nagy, K. Seefelder, W.; Dubois, M.; Destailats, F. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part II: Practical recommendations for effective mitigation. *Food Chemistry*, **132**, 73-79 (2012).
- 21) Shimizu, M.; Weitkamp, P.; Vosmann, K.; Matthäus, B. Temperature Dependency When Generating Glycidyl and 3-MCPD Esters from Diolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **90**, 1449-1458 (2013).
- 22) Craft, B. D.; Nagy, K.; Sandoz, L.; Destailats, F. Factor impacting the formation of Monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters during palm (*Elaeis guineensis*) oil production. *Food Addit. Contam.*, **29**, 354-361 (2012).
- 23) 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).
- 24) Shimizu, M.; Moriwaki, J.; Shiiba, D.; Nohara, H.; Kudo, N.; Katsuragi, Y. Elimination of Glycidyl Palmitate in Diolein by Treatment with Activated Bleaching Earth. *J. Oleo Sci.*, **61**, 23-28 (2012).
- 25) 食品安全委員会, 高濃度にジアシルグリセロール (DAG) を含む食用油等に関連する情報 (2015), http://www.fsc.go.jp/sonota/dag/dag_index.html
- 26) Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.*, **14**, 4426 (2016).
- 27) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Safety evaluation of certain food additives and contaminants. 3-chloro-1, 2-propanediol. WHO Food Additives Series: **48** (2001).

- 28) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 83th meeting (2016),
<http://www.fao.org/3/a-bq821e.pdf>
- 29) 農林水産省, 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) ,
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/seisaku/pdf/141217-02.pdf>
- 30) 農林水産省, 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に関する情報 平成26年度調査結果,
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/mcpde/h26_ganyu.html
- 31) Kaze, N.; Sato, H.; Yamamoto, H.; Watanabe, Y. Improvement of accuracy in quantification of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters by Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft standard methods C-III 18. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 1168-1171 (2011).
- 32) Shimizu, M.; Kudo, N.; Shiro, H.; Yasunaga, K.; Masukawa, Y.; Kasturagi, Y.; Yasumasu, T. Comparison of Indirect and Direct Quantification of Glycidol Fatty Acid Ester in Edible Oils. *J. Oleo Sci.*, **59**, 535-539 (2010).
- 33) Hrnčirik, K.; Zelinkova, Z.; Ermacora, A. Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1, 2-diol esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 361-367 (2011).
- 34) Sato, H.; Kaze, N.; Yamamoto, H.; Watanabe, Y. 2-Monochloro-1, 3-propanediol (2-MCPD) Dynamics in DGF Standard Methods and Quantification of 2-MCPD. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **90**, 1121-1130 (2013).
- 35) Crews, C.; Chiodini, A.; Granvogl, M.; Hamlet, C.; Hrnčirik, K.; Kuhlmann, J.; Lampen, A.; Scholz, G.; Weisshaar, R.; Wenzl, T.; Jasti, P.R.; Seefelder, W. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. *Food Addit. Contam. A*, **30**, 11-45 (2012).

- 36) 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 Food Sci. Technol.*, **48**, 204-208 (2012).
- 37) 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. A*, **30**, 52-68 (2013).
- 38) Hori, K.; Matsubara, A.; Uchikata, T.; Tsumura, K.; Fukusaki, E.; Bamb T. 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. Chrom. A*, **1250**, 99-104 (2012).
- 39) 日本油化学会編 基準油脂分析試験法, 2.4.13.2013 (2013).
- 40) *Joint AOCS/JOCS Official Method* (Am. Oil Chem. Soc. ed.), Cd 28-10 (2013).
- 41) Ermacora, A.; Hrnčirik, K. A Novel Method for Simultaneous Monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and Glycidyl Esters in Oils and Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **90**, 1-8 (2013).
- 42) Kuhlmann, J. Determination of bound 2, 3-epoxy-1-propane (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 335-344 (2011).
- 43) Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft: DGF Standard Methods C-IV 18 (10). Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and 2, 3-epoxypropane-1-ol (glycidol). Determination in oils and fats by GC-MS (Differential measurement), (2011).
- 44) *AOCS Official Method* (Am. Oil Chem. Soc. ed.), Cd 29a-13 (2013).
- 45) *AOCS Official Method* (Am. Oil Chem. Soc. ed.), Cd 29b-13 (2013).
- 46) *AOCS Official Method* (Am. Oil Chem. Soc. ed.), Cd 29c-13 (2013).

- 47) 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).
- 48) *The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan*. Committee, J. P. E. Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. (2011).
- 49) Koyama, K.; Miyazaki, K.; Abe, K.; Egawa, Y.; Fukazawa, T.; Kitta, T.; Miyashita, T.; Nezu, T.; Nohara, H.; Sano, T.; Takahashi, Y.; Taniguchi, H.; Yada, H.; Yamazaki, K.; Watanabe, Y. Alternative Internal Standard Calibration of an Indirect Enzymatic Analytical Method for 2-MCPD Fatty Acid Esters. *J. Oleo Sci.* **66**, 585-590 (2017).
- 50) Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual 23rd ed., 68-70 (2015).
- 51) Linnet K. Estimation of the linear relationship between the measurements of two methods with proportional errors. *Stat. Med.*, **9**, 1463-73 (1990).
- 52) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2015)
<https://www.R-project.org/>
- 53) Manuilova E., Andre Schuetzenmeister A., Model F. mcr: Method Comparison Regression. R package version 1.2.1. (2014). <https://CRAN.R-project.org/package=mcr>
- 54) Chung, S. W. C.; Chan, B. T. P. 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).
- 55) Seefelder, W.; Varga, N.; Studer, A.; Williamson, G.; Scanlan, F. P.; Stadler, R. H. 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).
- 56) 日本油化学会編 基準油脂分析試験法, 『基準油脂分析試験法 共4-2013 合同実験実施の手引き』 (2013)

- 57) 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).
- 58) Matthäus, B.; Vosmann, K.; Weitkamp, P.; Grundmann, D.; Kersting, H. J. Degradation of glycidyl esters in RBD palm oil as a function of storage conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **118**, 418-424 (2016).
- 59) AOAC Int., Appendix D. Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed.* Gaithersburg, USA (2005).
- 60) Thompson, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst.* **125**, 385-386 (2000).
- 61) Collison, M. W. Current status of MCPD and Glycidol Analysis in Oils. *104th AOCS Annual Meeting*, Montreal, Canada, Presentation (2013).
- 62) Wenzl, T.; Samaras, V.; Giril, A.; Buttinger, G.; Karasek, L.; Zelinkova, Z. Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food. EFSA supporting publication EN-779 (2015).
- 63) Koyama, K.; Miyazaki, K.; Abe, K.; Egawa, Y.; Kido, H.; Kitta, T.; Miyashita, T.; Nezu, T.; Nohara, H.; Sano, T.; Takahashi, Y.; Taniguchi, H.; Yada, H.; Yamazaki, K.; Watanabe, Y. Collaborative Study of an Indirect Enzymatic Method for the Simultaneous Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and Glycidyl Esters in Edible Oils. *J. Oleo Sci.*, **65**, 557-568 (2016).

- 64) 日本油化学会編 基準油脂分析試験法, 基準法 2.4.14-2016 (2016).
- 65) 神山和夫, 宮崎絹子, 2-/3-MCPD脂肪酸エステル, グリシドール脂肪酸エステル 間接分析法 (酵素法) の開発, オレオサイエンス, **17**, 171-178 (2017).
- 66) Tanaka, Y.; Hirano, J.; Funada, T. Concentration of Docosaehaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase.*J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 1210-1214 (1992).
- 67) Maruyama, K. *Science and industry* (in Japanese), **75**, 75-80 (2001).
- 68) 日本油化学会編 基準油脂分析試験法, 推奨法 奨7-2017 (2017).
- 69) Ermacora, A.; Hrncirik, K. Development of an analytical method for the simultaneous analysis of MCPD esters and glycidyl esters in oil-based foodstuffs. *Food Addit Contam Part A*, **31**, 985-994 (2014).
- 70) *AOCS Draft Method* (Am. Oil Chem. Soc. ed.), Cd 30-15 (2015).
- 71) Zelinkova, Z.; Giri, A.; Wenzl, T. Assessment of critical steps of a GC/MS based indirect analytical method for the determination of fatty acid esters of monochloropropanediols (MCPDEs) and of glycidol (GEs). *Food Control.*, **77**, 65-75 (2017).
- 72) European Commission Joint Research Centre. Standard Operating Procedure for Simultaneous Determination of 3-MCPD, 2-MCPD and Glycidyl Fatty Acid Esters in Various Food Matrices by Derivatisation in Organic Phase. JRC Standard Operating Procedure. In-house validated by the EC-JRC (2016).
- 73) European Commission Joint Research Centre. Standard Operating Procedure for Simultaneous Determination of 3-MCPD, 2-MCPD and Glycidyl Fatty Acid Esters in Various Food Matrices by Derivatisation in Aqueous Phase. JRC Standard Operating Procedure. In-house validated by the EC-JRC (2016).

謝辞

本論文は、ハウス食品グループ本社株式会社において2010年から2016年度までの6年間で行った研究をまとめたものです。本論文の審査にあたり、主査を引き受けてくださった東京大学大学院農学生命科学研究科の内田浩二教授、副査を引き受けてくださった東京大学大学院農学生命科学研究科の作田庄平准教授、鈴木道生准教授、東北大学大学院農学研究科仲川清隆教授に感謝申し上げます。また、本論文の執筆にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科の加藤久典教授に謹んで感謝の意を表します。主査、副査の先生方の的確なご指摘、ご助言のおかげで、本論文を完成させることができました。

本研究の合同試験は、酵素的間接分析法を公定法にしようという弊社の意志に賛同いただいた13機関〔株式会社ADEKA、地方独立法人大阪市立工業研究所（現、大阪産業技術研究所 森之宮センター）、花王株式会社、キューピー株式会社、株式会社J-オイルミルズ、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、日清オイリオグループ株式会社、一般財団法人日本食品分析センター、公益社団法人日本食品油脂検査協会、一般社団法人日本油料検定協会、一般財団法人日本冷凍食品検査協会（現、日本食品検査）、株式会社ハウス食品分析テクノサービス、不二製油株式会社〕のMCPD脂肪酸エステル等（間接法）小委員会の委員及び合同試験試料の分析をしていただいた皆様のご協力、ご尽力のおかげで成功しました。心から感謝いたします。また、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録にあたり、日本油化学会規格試験法委員会、及び試験法企画小委員会の委員の皆様には、多大なご助言を頂戴したことを厚く御礼申し上げます。魚油試料の提供と有益なご助言を頂きました地方独立法人大阪市立工業研究所（現、大阪産業技術研究所 森之宮センター） 渡辺嘉博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、うまくいかない時期が続いた時にも、諦めずに研究を続けられるよう後押しいただいた、ハウス食品グループ本社 基礎研究部 柘植信昭博士、

ならびに基礎研究部次長 平尾宜司博士に深く感謝いたします。投稿論文の執筆にあたり、英文の添削、実験データへのご指摘、ご指南をしていただいたハウス食品 開発研究所 企画運営部 澤田博博士に心から御礼申し上げます。ハウス食品グループ本社 基礎研究部1グループ長の神山和夫博士には、基礎研究部への配属当初から現在まで分析技術や研究の基礎について、懇切なる御指導を頂きましたことを心から感謝申し上げます。酵素的間接分析法に関する研究を二人三脚で進める上で、時に暖かく見守り、時に叱咤激励をして頂いたおかげで、本論文としてまとめることができました。また、日頃の研究の実施にあたり、ディスカッションやご助言をして頂きましたハウス食品グループ本社 基礎研究部の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の仕事に理解を示し、精神的に支え、「お母さん、お仕事頑張っね」といつも笑顔で応援してくれた息子と夫に心から感謝します。

平成29年6月

ハウス食品グループ本社株式会社
研究開発本部 基礎研究部 1グループ
宮崎（中村） 絹子

論文目録

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).

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).

Koyama, K.; Miyazaki, K.; Abe K.; Egawa, Y.; Kido, H.; Kitta T.; Miyashita, T.; Nezu, T.; Nohara, H.; Sano, T.; Takahashi, Y.; Taniguchi, H.; Yada, H.; Yamazaki, K.; Watanabe, Y. Collaborative Study of an Indirect Enzymatic Method for the Simultaneous Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and Glycidyl Esters in Edible Oils. *J. Oleo Sci.*, **65**, 557-568 (2016).

Miyazaki, K.; Koyama, K. Application of Indirect Enzymatic Method for Determinations of 2-/3-MCPD-Es and Gly-Es in Foods Containing fats and Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **93**, 885-893 (2016).

Miyazaki, K.; Koyama, K. An Improved Enzymatic Method for Simultaneous Determinations of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Fish Oils. *J. Oleo Sci.*, **66**, 1085-1093 (2017).