

國立臺灣海洋大學食品科學系

碩士班專題討論

探討3-單氯丙二醇酯類之毒性及其測定方式

任課老師：黃意真 老師

宋文杰 老師

指導老師：洪良邦 老師

學 號：10432038

學 生：劉重慶 (5115)

報告日期：105 年 10 月 26 日

內容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授簽名：

探討 3-單氯丙二醇酯類之毒性及其測定方式

劉重慶 (5115)

2016/10/26

大綱

- 一、前言
- 二、3-單氯丙二醇酯類之急性口服毒性及細胞毒性
- 三、以氣相層析儀搭配質譜儀測定烹飪油中 3-單氯丙二醇酯類含量
- 四、以液相層析儀方法測定油脂中 3-單氯丙二醇酯類含量
- 五、結論

摘要

3-單氯丙二醇 (3-monochloropropane-1,2-diol, 3-MCPD) 為一種已知的致癌物且具有腎毒性，近年來的文獻指出，大多數 3-MCPD 以酯類 (3-MCPD esters) 形式存在，且許多食物皆含 3-MCPD 酯類，因此被認為具有食安顧慮，另有文獻指出，在食用油發現 3-MCPD 酯類產生，顯示其形成之機制與精煉油的過程有關。因此，探討 3-MCPD 酯類之毒性及其在油脂中之檢測方式。測定單棕櫚醯基 3-MCPD (3-MCPD 1-monopalmitate) 及雙棕櫚醯基 3-MCPD (3-MCPD dipalmitate) 於瑞士小鼠中之急性口服毒性及其於 NRK-52E 大鼠腎臟細胞之細胞毒性，3-MCPD 1-monopalmitate 結果顯示其半致死劑量 (median lethal dose, LD₅₀) 為 2676.81 mg/kg body weight (BW)，死亡小鼠中之平均體重減少及顯著地增加血清尿素氮及肌酸酐增加，且有腎小管壞死、蛋白質管型及生精小管中精子細胞減少之現象。細胞存活率 (MTT assay) 及乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 試驗結果顯示僅 3-MCPD 1-monopalmitate 於 NRK-52E 大鼠腎臟細胞中具有劑量依賴性之細胞毒性。在測定方法方面，以氣相層析儀搭配質譜選擇檢測器 (gas chromatography- mass selective detector, GC-MSD) 經衍生化進行定量分析，3-MCPD 酯類在未精煉原油 (crude palm oils, CPO) 中為未檢出，但是在脫色油 (bleached oils, BPO) 中發現有微量檢出，而在脫臭 (deodorized oils) 或完全精煉後的油 (fully refined oils, RBD) 中含有更高的 3-MCPD 酯類含量。以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 未進行衍生化的定量分析，配合超高效能液相層析儀搭配飛行時間質譜儀 (ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF MS) 輔助定性分析結果，3-MCPD 二酯和 3-MCPD 單酯均達成了基線分離並且分佈在不同滯留時間的兩個波峰。綜合上述結果，3-MCPD 單酯具有急性口服毒性及細胞毒性，且可以 HPLC 及 GC 方法做 3-MCPD 酯類之定性與定量分析。

一、前言

3-單氯丙二醇 (3-monochloro-1,2-propanediol, 3-MCPD) 的構造非常簡單，類似甘油，僅將第三個碳位置的 OH 基以氯離子取代，室溫下呈現如稻草般顏色的淡黃色液體。早期應用於降低火藥的凝固點、染料的中間媒介物以及齧齒目動物的化學殺菌劑 (樂, 2002)。國際癌症研究機構 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 依據 3-單氯丙二醇的動物實驗，認為腎小管腫瘤 (renal tubular tumors) 及間質細胞瘤 (Leydig cell adenomas) 與其有關，判定 3-單氯丙二醇對人體具致癌性 (IARC Monographs, 2012)。我國行政院衛生福利部於民國 102 年 8 月 20 日公告修訂《醬油類單氯丙二醇衛生標準》，醬油類中 3-單氯丙二醇之含量應在 0.4 ppm 以下 (行政院衛生福利部, 2013)。3-單氯丙二醇脂肪酸酯 (fatty acid esters of 3-MCPD) 在特定狀況經水解會產生游離的 3-MCPD，被認為潛在的食安風險因子，其具有 3-MCPD 的架構，架構上的氫氧基 (hydroxyl-groups) 部分或完全的被脂肪酸酯化而形成酯類，並根據被酯化的氫氧基分為單酯類及二酯類 (Buhrke *et al.*, 2011; Seefelder *et al.*, 2008)。許多食品中有 3-MCPD 酯類的檢出，如：麵包、咖啡、精煉植物油、嬰兒奶粉、鹹餅乾、黑麥芽、炸薯條、甜甜圈、醃橄欖及鮭魚 (Hamlet and Sadd, 2004; Pudiel *et al.*, 2011; Svejková *et al.*, 2004; Weißhaar, 2011; Zelinková *et al.*, 2009; Zelinková *et al.*, 2006)。有研究指出 1-棕櫚酸基 (1-palmitoyl)、1-硬脂酸基 (1-steroyl)、2-油酸基 (2-oleoyl) 和 1-棕櫚酸基-2-油酸基 (1-palmitoyl-2-oleoyl) 3-MCPD 酯具有細胞毒性 (Tee *et al.*, 2011)，並發現雄性大鼠的腎臟及睪丸為作用器官，具有劑量依賴性毒性 (EFSA, 2011)。2001 年，世界糧農組織及衛生組織食品添加劑專家聯合委員 (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JEFCA) 會訂出臨時的最大每日容許攝取量 (tolerable daily intake, TDI) 為 2 mg 3-MCPD/kg BW (JEFCA, 2001)。近年來，有文獻發現在食用油發現較多的 3-MCPD 酯類 (Zelinková *et al.*, 2006)。而在油脂中，3-MCPD 會以游離及酯化形式產生，並且大部分的 3-MCPD 會以二酯類的形式產生 (Seefelder *et al.*, 2008)。至今有許多測定 3-MCPD 酯類之方法被開發出來並大略分成兩類：GC-MS 及 LC-MS。GC-MS 的步驟如下：以酸或鹼進行 3-MCPD 酯類之轉酯作用釋出 3-MCPD，之後將 3-MCPD 以不同試劑進行衍生化，最後以 GC-MS 進行測定 (Divinová *et al.*, 2007; Razak *et al.*, 2012)。LC-MS 則是以超高效能液相層析儀搭配質譜儀 (ultra-high performance liquid chromatography-mass, UHPLC-MS) (Moravcova *et al.*, 2012) 或是液相層析儀搭配飛行時間質譜儀 (time-of-flight mass, LC-TOF-MS) (Haines *et al.*, 2011) 進行單一 3-MCPD 酯類未經衍生化之直接測定。故本篇目的為探討 3-MCPD 酯類之潛在毒性及其測定方式。

二、3-單氯丙二醇酯類之急性口服毒性及細胞毒性

管餵方式餵食 1-棕櫚酸基 3-MCPD (1-palmitoyl-3-chloropropanediol, 3-MCPD 1-monopalmitate) 之瑞士小鼠隨機分為六組 ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$)，控制組、五種劑量組 (1000、1428、2040、2914 及 4162 mg/kg BW) 及餵食 1,2-雙棕櫚酸基 3-MCPD (1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropane-diol, 3-MCPD dipalmitate) 之小鼠分為兩組：控制組 ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$) 及試驗組 ($n = 10/\text{sex}/\text{group}$)，持續 14 天，第 15 天進行犧牲，測定其致死率及在腎臟、睪丸或卵巢、肝臟、胸腺及脾臟進行組織病理學試驗，以及測定血清尿素氮及肌酸酐。於 NRK-52E 大鼠腎臟細胞，以 MTT 試驗測細胞存活率，以及以 LDH 試驗為細胞壞死之指標，分析其對 NRK-52E 大鼠腎臟細胞之細胞毒性，游離態 3-MCPD 作為參考值。

Table 1 為餵食各劑量 3-MCPD 1-monopalmitate 之小鼠存活率，並測得 3-MCPD 1-monopalmitate 之 LD50 值測得為 2676.81 mg/kg BW。Fig. 1 為餵食 3-MCPD dipalmitate 之存活率曲線，雄性及雌性之存活率分別為 70% 及 90%，得出致死率為 20%，3-MCPD dipalmitate 則在初步試驗較低毒性，因此以限量試驗測定急性其口服毒性，得出其 LD50 值約高於 5000 mg/kg BW，在 GHS 分類系統中為無毒性。致死率結果顯示 3-MCPD 1-monopalmitate 之口服毒性大於 3-MCPD dipalmitate。Fig. 2 為餵食 3-MCPD 1-monopalmitate 小鼠之平均體重變化圖，可發現餵食 2040 及 2914 mg/kg BW 之組別，其體重增加量會隨劑量增加而減少；餵食 4162 mg/kg BW 之小鼠在四天內全部死亡且其體重並無逐漸增加，顯示 3-MCPD 1-monopalmitate 之急性口服毒性會隨劑量增加而增加。Table 2 顯示為餵食 3-MCPD 1-monopalmitate 的死亡小鼠之各個器官絕對重量，觀察到在肝臟、腎臟、脾臟、胸腺及睪丸或卵巢的絕對重量顯著的降低。Table 3 顯示餵食 3-MCPD 1-monopalmitate 的小鼠之血清尿素氮及肌酸酐結果，可觀察到餵食 4162 mg/kg BW 3-MCPD 1-monopalmitate 之死亡小鼠相較於控制組及存活小鼠，其血清尿素氮及肌酸酐顯著增加，此結果顯示 3-MCPD 1-monopalmitate 可能造成急性腎衰竭及腎小管壞死，如 Fig. 3 所示。Fig. 3 為 3-MCPD 1-monopalmitate (A 及 B) 3-MCPD dipalmitate (C 及 D) 及控制組 (E 及 F) 之腎切片之染色結果，在 Fig. 3A 及 3C 可觀察到局部性變性及腎小管細胞壞死，在 Fig. 3B 及 3D 可觀察到蛋白質管型的出現，此腎毒性之結果作者推測一部份是由 3-MCPD 酯類經動物腸道之脂肪酶水解釋出游離態 3-MCPD 而造成。Fig. 4 為 3-MCPD 1-monopalmitate (A)、3-MCPD dipalmitate (B) 及控制組 (C) 雄性小鼠之睪丸切片染色圖，在 Fig. 4A 及 4B 可觀察到生精小管中的精子細胞減少及構造細胞的剝離。Fig. 5 為以 MTT 試驗 (A) 及 LDH 試驗 (B) 測得之 NRK-52E 大鼠腎細胞毒性結果。在 Fig. 5A 中，濃度為 100 及 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 組別，有顯著的抑制大鼠腎細胞增殖；在 3-MCPD dipalmitate 在腎細胞中無顯著抑制效果，且由於其難溶於水溶性培養基，因此無法測試更高濃度；在控制組與 0.1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之游離態 3-MCPD 之間無觀察到顯著差異，結果顯示 3-MCPD 1-monopalmitate 在體外試驗中較游離態 3-MCPD 更具有細胞毒性。在 Fig. 5B 中，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之 3-MCPD 1-monopalmitate 組有顯著較高的 LDH 活性，且其活性有劑量依賴性；而 3-MCPD dipalmitate 則無顯著差異；而游離態 3-MCPD 組與 3-MCPD 1-monopalmitate 組無顯著差異，顯示它們間的毒性有潛在關聯性。

三、以氣相層析儀搭配質譜儀測定烹飪油中 3-單氯丙二醇酯類含量

樣品由馬來西亞不同精煉廠收集一不同精煉過程之棕櫚油產品，如天然棕櫚油 (crude palm oil, CPO)、脫色油 (bleached oil, BPO)、精煉油 (fully refined oil, RBD)、軟質棕櫚油 (palm olein) 及硬質棕櫚油 (palm stearin)，以及市售烹飪油作為分析。該方法參考至德國聯邦風險評估協會 (Federal German Institute for Risk Assessment, FGIRA) 之 BfR Method 008 且改良為不同的水解時間 (FGIRA, 2009)，首先將油脂樣品加入內部標準品氘化 3-單氯丙二醇酯 (deuterated free 3-MCPD, d_5 -3-MCPD) 後，以硫酸進行酸性轉酯作用，經 16、18 和 20 小時水解後，加入碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 及硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 進行中和及鹽析，最後以苯基硼酸 (PBA) 進行衍生化並以 GC-MS 進行分析樣品的 3-MCPD 酯類含量。選擇四種 3-MCPD 濃度：0.25、1.0、4.0 及 6.0 mg/kg，測定本方法之回收率。

Table 4 為不同水解時間對 3-MCPD 及 d_5 -3-MCPD 平均波峰面積比例之表現結果，在轉酯作用時間為 18 及 20 h 之結果並無發現有顯著差異，並且 18 h 之結果具有良好的回收率因此選其作為本次實驗轉酯作用時間。Table 5 顯示各個濃度之回收率結果，最低回收率為 97.6%，最高回收率為 107.9%，回收率於 70-120% 之範圍內為可接受數據 (Jiang, 2005)。而此方法之再現性，以相對標準偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示，在 3-MCPD 酯類濃度為 0.25、1.0、4.0 及 6.0 mg/kg，再現性分別為 0.02、0.03、0.12 及 0.11%，具良好精確性。Fig. 6 為樣品中內標準品 d_5 -3-MCPD 及衍生化 3-MCPD 之氣相層析圖譜，顯示 d_5 -3-MCPD 及衍生化 3-MCPD 具有明顯之波峰。Fig. 7 為 3-MCPD 酯類之標準曲線，Y 軸為 d_5 -3-MCPD 及衍生化 3-MCPD 之面積比例，X 軸為 3-MCPD 添加比例 (mg/kg)，顯示具有良好線性 ($r^2 \geq 0.999$)。該方法之偵測極限 (limit of detection, LOD) 為 0.25 mg/kg，定量極限 (limit of quantification, LOQ) 為 0.50 mg/kg。Fig. 8 為馬來西亞棕櫚油樣品中 3-MCPD 酯類之百分比分布，樣品數總計為 324 件，分為 (a) 天然棕櫚油 (CPO) (b) 脫色油 (c) 精煉棕櫚油 (RBD) (d) RBD 軟質棕櫚油及 (e) RBD 硬質棕櫚油，在 105 件 CPO 中，約 80% 的樣品未檢出 3-MCPD 酯類，而約 10% 的樣品低於 LOD (0.25 mg/kg)；在 56 件脫色油中，約 50% 的樣品低於 LOD (0.25 mg/kg)，剩餘的樣品測得量為 0.25-1.8 mg/kg，平均為 0.37 mg/kg；僅 1% 的 RBD 棕櫚油樣品在 LOD 以下，約 56% 的樣品測得量為 0.25-2.0 mg/kg，剩餘 43% 有較高值，最大值為 5.8 mg/kg；在 54 件 RBD 軟質棕櫚油中，僅 2% 的樣品在 LOD 以下，多數樣品測得量為 1.4-3.2 mg/kg，最大為 4.0 mg/kg；在 RBD 硬質棕櫚油中，約 20% 的樣品測得量為 1.5 mg/kg，而有約 40% 低於平均值 (1.25 mg/kg)，剩餘的樣品集中在 1.25-1.8 mg/kg，顯示 3-MCPD 酯類相對於 RBD 硬質棕櫚油 (1.6-1.8 mg/kg)，較優先分布到 RBD 軟質棕櫚油 (3.0-3.8 mg/kg)。Fig. 9 為由五家精煉廠收集來的不同棕櫚油產品之 3-MCPD 酯類含量，在所有 CPO 樣品中未檢出 3-MCPD 酯類，而在脫色及最終處理階段有發現酯類產生，在脫色及精煉棕櫚油中酯類含量分別為 0.25-0.9 mg/kg 及 2.25-3.7 mg/kg，結果顯示精煉後的棕櫚油含有較高的 3-MCPD 酯類含量，是由脫臭過程中使用的高溫所造成。Fig. 10 為多種市售植物油之 3-MCPD 酯類含量，最高含量出現於橄欖粕油、軟質棕櫚油及油酸/花生/芝麻油之混和中為 1.65-2.45 mg/kg，另外，可發現橄欖粕油較初榨橄欖油高，顯示其為經精煉之結果。

四、以液相層析儀方法測定油脂中3-單氯丙二醇酯類含量

以油酸 (oleic acid) 做為基底，參考 Haines 等人 (2011) 之方法，自行合成 3-MCPD 酯類之參考物。將秤好之油樣品以乙腈進行離心萃取，以 HPLC 進行 3-MCPD esters 分離，收集並合併含有 3-MCPD 酯類的兩種沖提液，以 UPLC-Q-TOF MS 進行 3-MCPD 酯類的定性分析；以 HPLC 搭配蒸發光散射偵檢器 (evaporative light scattering detector, ELSD)，且不需經過衍生化，進行 3-MCPD 酯類的定量及定性分析。定量分析分別以滯留時間為 5.8 和 7.6 分鐘之波峰面積做計算。1,2-雙油酸基 (1,2-dioleoyl-) 3-MCPD 為 3-MCPD 二酯之標準物質；1-硬脂酸基 (1-stearoyl-) 3-MCPD 為 3-MCPD 單酯之標準物質。評估該 HPLC 方法之線性、精確度、準確度、回收率、LOD 及 LOQ。最後抽選市售食用油之樣品檢測其 3-MCPD 酯類含量。

三酸甘油酯為油脂主要成分，約佔 90%，在測定 3-MCPD 酯類前需去除其他干擾成分。Fig. 11 為 (A) 3-MCPD 酯之標準物乙腈溶液 (0.2 mg/mL)、(B) 乙腈萃取食用混合油 (250 mg/mL) 及 (C) 乙腈萃取一級花生油 (250 mg/mL) 之 HPLC 圖譜，圖 B 及圖 C 顯示出乙腈萃取之油樣品仍然有許多干擾成分，這些干擾成分可以藉由收集含有 3-MCPD 二酯及 3-MCPD 單酯之沖提液來去除，根據圖 A 中 3-MCPD 酯類標準物質之滯留時間來得到收集時間，以此方式分離樣品中的 3-MCPD 酯類。Table 6 為以 UPLC-Q-TOF MS 分析自製 3-MCPD 酯類參考物之定性結果，在自製之參考物中發現 12 種 3-MCPD 酯類，且大多數酯類之相對誤差低於 0.07%，其質譜圖如 Fig. 12 所示，可發現其脂肪酸組成在油脂中非常常見，因此自製 3-MCPD 酯類參考物可應用於 3-MCPD 酯類之定量方法，Fig. 12 中可觀察到參考物中多數為 3-MCPD 二酯類，如 1-油酸基-2-亞麻油酸基(1-oleoyl-2-linoleoyl) 3-MCPD (1.91×10^4)、1,2-雙油酸基 (1,2-dioleoyl) 3-MCPD 及 1-硬脂酸基-2-油酸基 (1-stearoyl-2-oleoyl) 3-MCPD (1.54×10^4)。Fig. 13 為 3-MCPD 酯類之標準物、自製參考物及乙腈萃取玉米油之 HPLC 圖譜，可發現 3-MCPD 二酯及 3-MCPD 單酯分布在不同波峰且達成基線分離 (baseline separation)，圖 A 與圖 B 中，可發現 3-MCPD 二酯類之滯留時間皆相同 ($t_R = 5.8$ 分鐘)，3-MCPD 單酯之滯留時間皆相同 ($t_R = 7.6$ 分鐘)，因此其相應之面積可用於 3-MCPD 酯類之定量分析。Table 7 為 HPLC 方法定量分析 3-MCPD 酯類之驗證數據，同日間 (intraday) 精確度為 2.1-4.0%，異日間 (interday) 精確度為 3.2-5.6%，顯示 HPLC 方法對 3-MCPD 酯類定量之適合度；同日間及異日間準確度為 4.3-14.6%，顯示 HPLC 方法是準確的。3-MCPD 酯類之回收率皆在可接受範圍 (70-120%)。3-MCPD 二酯標準物的 LOD 與 LOQ 分別為 3.43 及 5.71 mg/mL；3-MCPD 單酯標準物的 LOD 與 LOQ 分別為 2.55 及 5.66 mg/mL。Table 8 為 18 個食用油樣品之 3-MCPD 酯類含量，可以發現在所有食用油樣品中未檢出 3-MCPD 單酯，而 3-MCPD 二酯在一些食用油樣品含有較高含量，顯示不同種油含有不同 3-MCPD 二酯之含量，是由於不同種食用油有不同組成有關。

五、 結論

1. 數據結果顯示 3-MCPD 1-monopalmitate 具有毒性，3-MCPD dipalmitate 之在 GHS 分類系統中分為無毒性。3-MCPD 酯類具有潛在的急性腎與睪丸毒性，如腎小管壞死、蛋白質管型及精子細胞減少。3-MCPD 1-monopalmitate 顯著地抑制大鼠腎細胞的增殖及增加 LDH 釋放量。
2. 以 GC-MS 分析油脂中之 3-MCPD 酯類含量，該方法回收率落於可接收範圍內 (70-120%)，標準曲線具有良好線性，LOD 及 LOQ 分別為 0.25 及 0.50 mg/kg。最終結果也觀察到在精煉之脫臭過程中所用的高溫，可能為造成精煉棕櫚油內 3-MCPD 酯類含量較高之原因。
3. 未經衍生化處理之 HPLC 方法測定油樣品中 3-MCPD 脂肪酸酯類之含量是可行的，3-MCPD 二酯和 3-MCPD 單酯均達成了基線分離並且分佈在不同滯留時間的兩個波峰中，驗證結果也顯示出良好的線性、重複性及低 LOQ。

參考文獻

- 行政院衛生福利部 (2013)。醬油類單氯丙二醇衛生標準。部授食字第 1021350146 號。
- 樂金水、蘇依科、陳林曦，2002，醬油中氯丙醇的研究發展。山東食品科技。12：1-3。
- Buhrke, T., Weisshaar, R., & Lampen, A. (2011). Absorption and metabolism of the food contaminant 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its fatty acid esters by human intestinal Caco-2 cells. *Archives of Toxicology*, 85(10), 1201-1208.
- Divinová, V., Dolezal, M., & Velisek, J. (2007). Free and bound 3-chloropropane-1, 2-diol in coffee surrogates and malts. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(1), 39.
- EFSA, 2011. Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study.
- Federal German Institute for Risk Assessment (FGIRA): BfR Method_82_FC-008-01. (2009). *Determination of 3-MCPD fatty acid esters in edible oils and solid fats by GC-MS - An indirect determination by detection of free 3-MCPD released from 3-MCPD esters by acid hydrolysis and by derivatization with phenylboronic acid.* Dahlem, Germany.
- Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P., & Collison, M. W. (2011). Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOF MS. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88(1), 1-14.
- Hamlet, C. G., & Sadd, P. A. (2004). Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech Journal of Food Sciences*, 22, 259-262.
- IARC, 2012. 1,3-Dichloro-2-propanol, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans.
- Jiang, W. (2005). Good laboratory practice in analytical laboratory. *American Journal of Science*, 1(2), 93-94.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA): 57th Meeting, 5-14 June 2001, Rome, Italy.
- Liu, M., Gao, B. Y., Qin, F., Wu, P. P., Shi, H. M., Luo, W., & Yu, L. L. L. (2012). Acute oral toxicity of 3-MCPD mono- and di-palmitic esters in Swiss mice and their cytotoxicity in NRK-52E rat kidney cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3785-3791.
- Moravcova, E., Vaclavik, L., Lacina, O., Hrbek, V., Riddellova, K., & Hajslova, J. (2012). Novel approaches to analysis of 3-chloropropane-1, 2-diol esters in vegetable oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(9), 2871-2883.
- Pudel, F., Benecke, P., Fehling, P., Freudenstein, A., Matthäus, B., & Schwaf, A. (2011). On the necessity of edible oil refining and possible sources of 3-MCPD and glycidyl esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 368-373.
- Razak, R. A. A., Kuntom, A., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Ramli, M. R., Hussein, R., & Nesaretnam, K. (2012). Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils. *Food Control*, 25(1), 355-360.
- Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, F. P., & Stadler, R. H. (2008). Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 25(4), 391-400.
- Svejkovska, B., Novotny, O., Divinova, V., Reblova, Z., Dolezal, M., & Velisek, J.

- (2004). Esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5), 190-196.
- Tee, V. P., Shahrim, Z., & Nesaretnam, K. (2001). Cytotoxicity assays and acute oral toxicity of 3-MCPD esters. In *Papers, 9th Euro Fed Lipid Congress*.
- Weißhaar, R. (2011). Fatty acid esters of 3 - MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 304-308.
- Zelinková, Z., Doležal, M., & Velíšek, J. (2009). Occurrence of 3-chloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *European Food Research and Technology*, 228(4), 571-578.
- Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., & Doležal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290-1298.
- Zhou, H., Jin, Q., Wang, X., & Xu, X. (2014). Direct measurement of 3-chloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in oils and fats by HPLC method. *Food Control*, 36(1), 111-118.

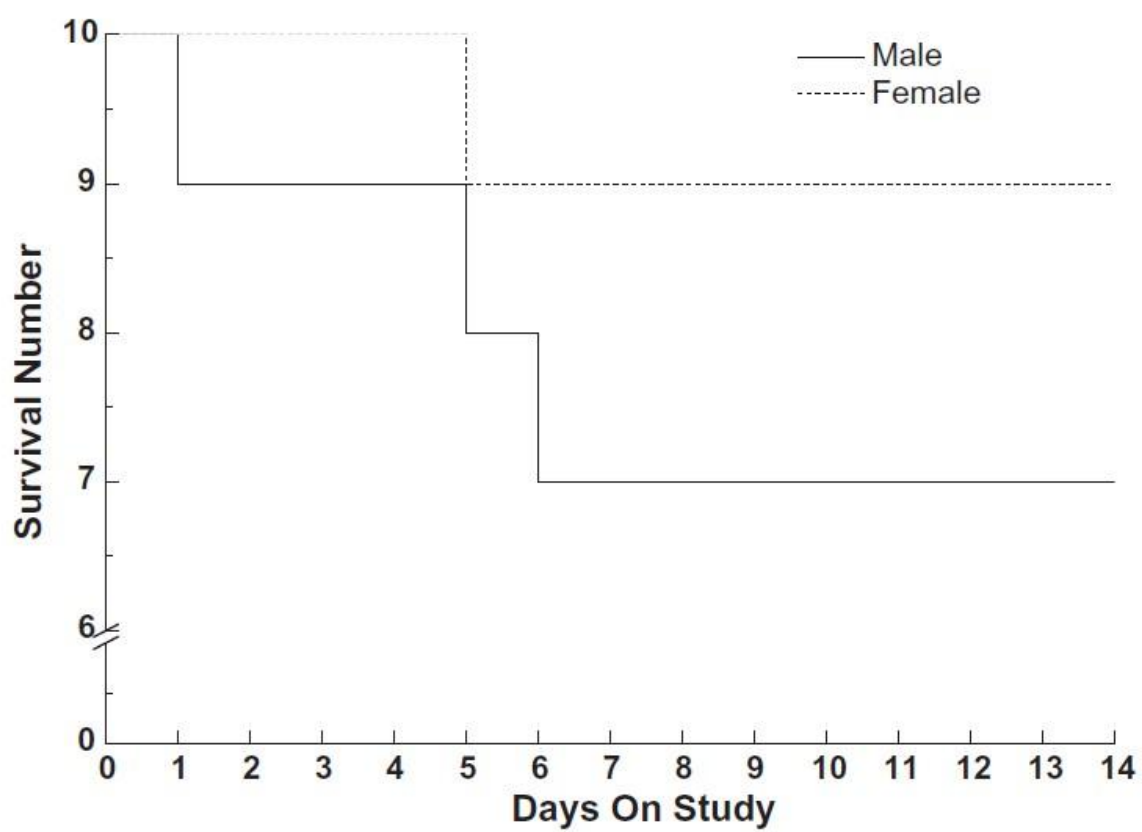


Fig. 1. Survival curve of Swiss mice fed 3-MCPD dipalmitate.

(Liu *et al.*, 2012)

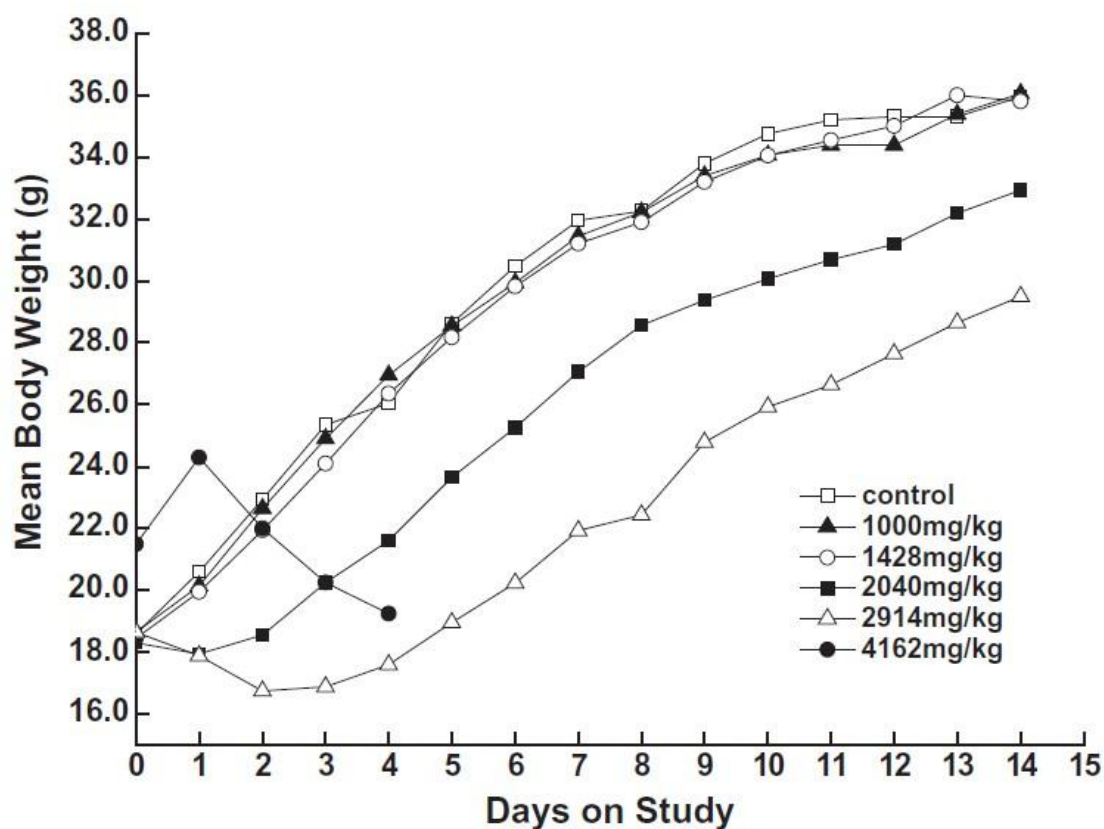


Fig. 2. Mean body weight of Swiss mice fed 3-MCPD 1-monopalmitate over the 14-day feeding period. Mice at about 4 weeks of age were randomly divided into six groups (untreated control, treatment I-1000 mg/kg body weight (BW), treatment II-1428 mg/kg BW, treatment III-2040 mg/kg BW, treatment IV-2914 mg/kg BW, treatment V-4162 mg/kg BW) consisting of 10 animals ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$). 3-MCPD 1-monopalmitate was dissolved in a vehicle of blended edible oil, and a dosing volume of 0.6 ml/20 g BW was used by oral gavage. Mice in the control group received oral gavage administration of vehicle only (0.6 ml/20 g BW).

(Liu *et al.*, 2012)

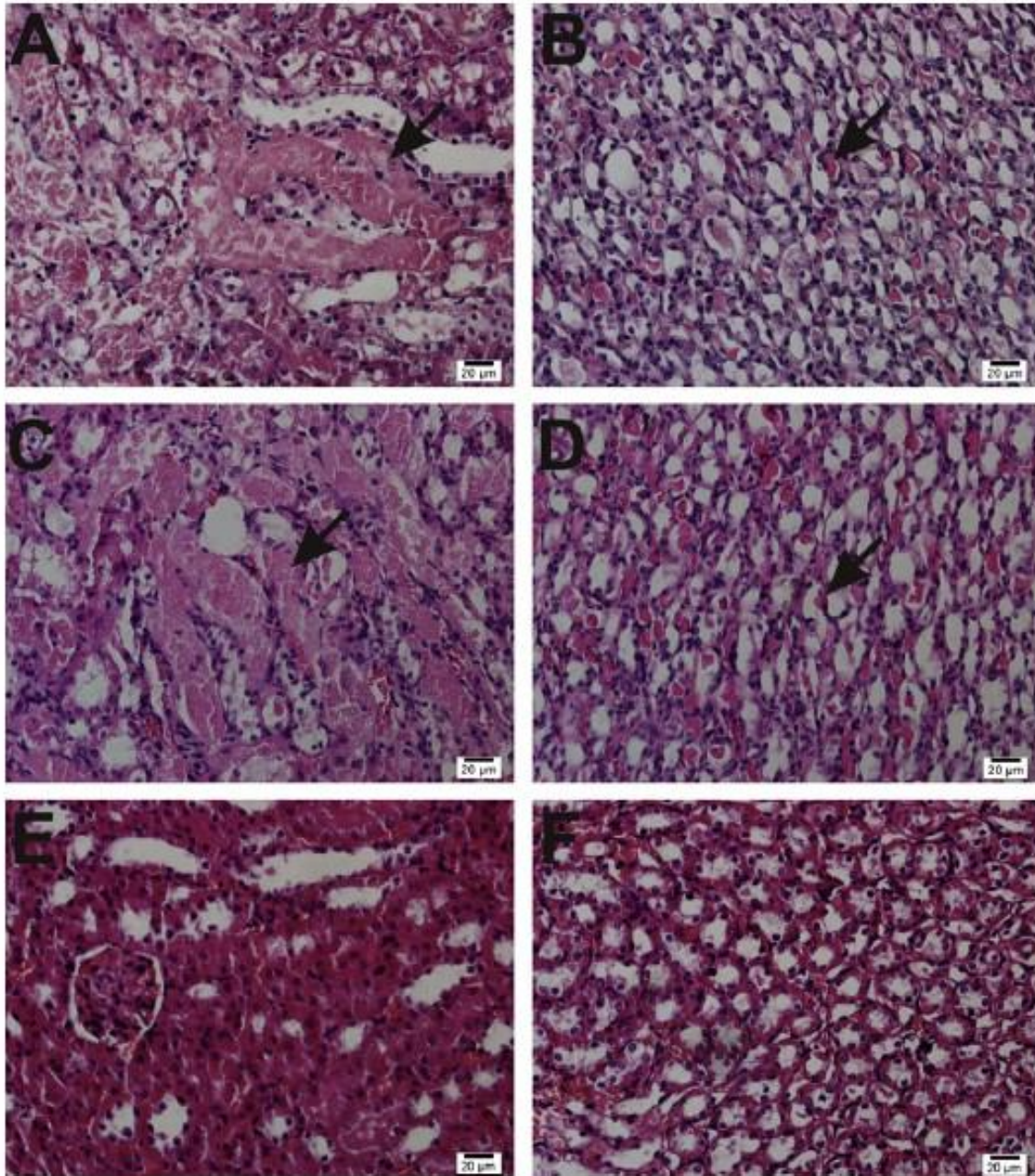


Fig. 3. Representative photographs of mice kidney sections from the normal control, 3-MCPD 1-monopalmitate and dipalmitate groups. (A) and (B), mice fed 4162 mg/kg 3-MCPD 1-monopalmitate; (C) and (D), mice fed 5000 mg/kg 3-MCPD dipalmitate; and (E) and (F), control mice. (A) and (C) showed renal tubular necrosis as compared with (E); and (B) and (D) showed protein casts scattered among the renal tubules as compared with (F). Hematoxylin–eosin staining (x 400).

(Liu *et al.*, 2012)

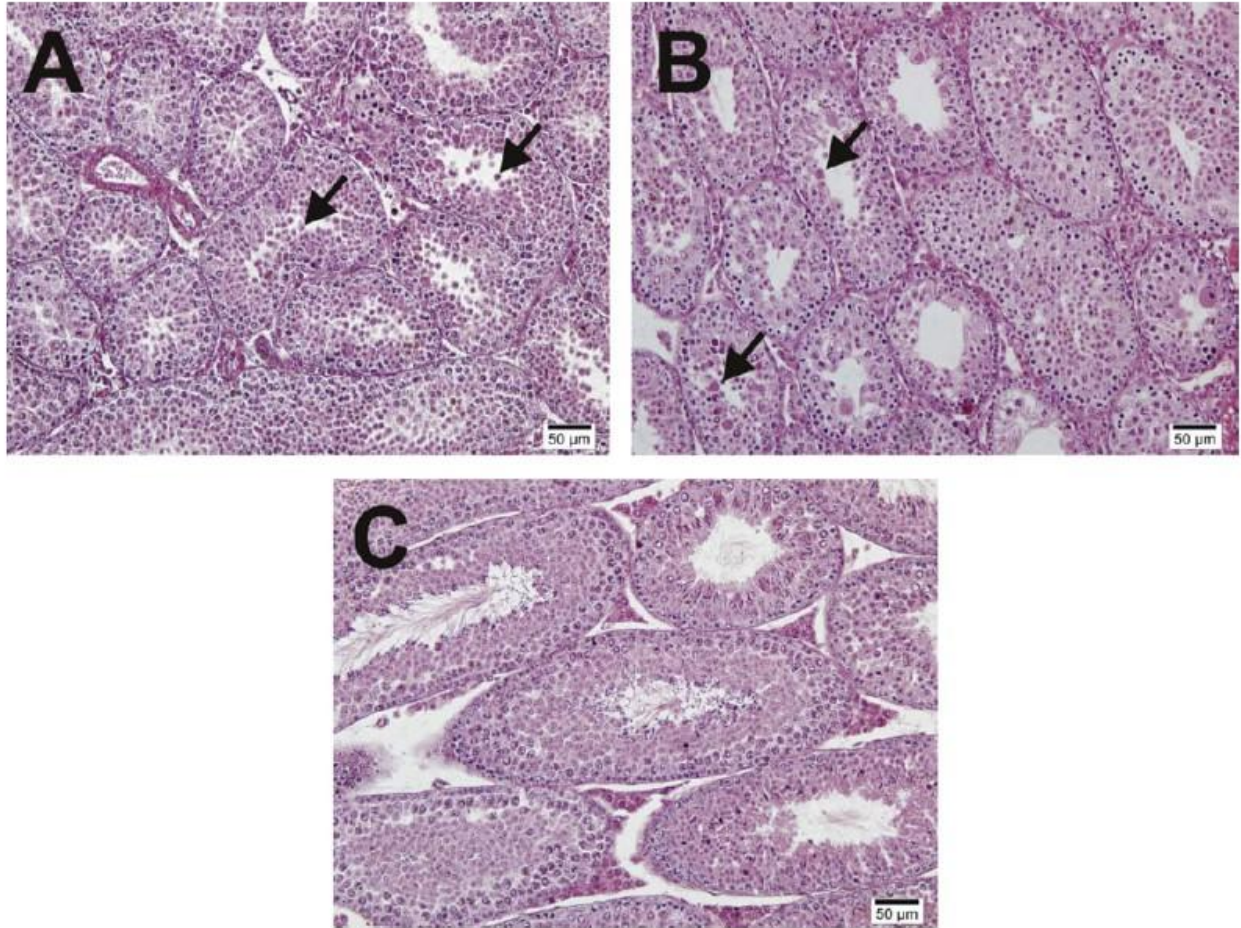


Fig. 4. Representative photographs of male mice testes sections from the control, 3-MCPD 1-monopalmitate and dipalmitate groups. (A) Male mice in 4162 mg/kg 3-MCPD 1- monopalmitate group; (B) male mice in 5000 mg/kg 3-MCPD dipalmitate group; (C) control mice. (A) and (B) showed decrease of spermatids in a single seminiferous tubule, disperse array and desquamation of the constructive cells as compared with (C). Hematoxylin–eosin staining (x 200).

(Liu *et al.*, 2012)

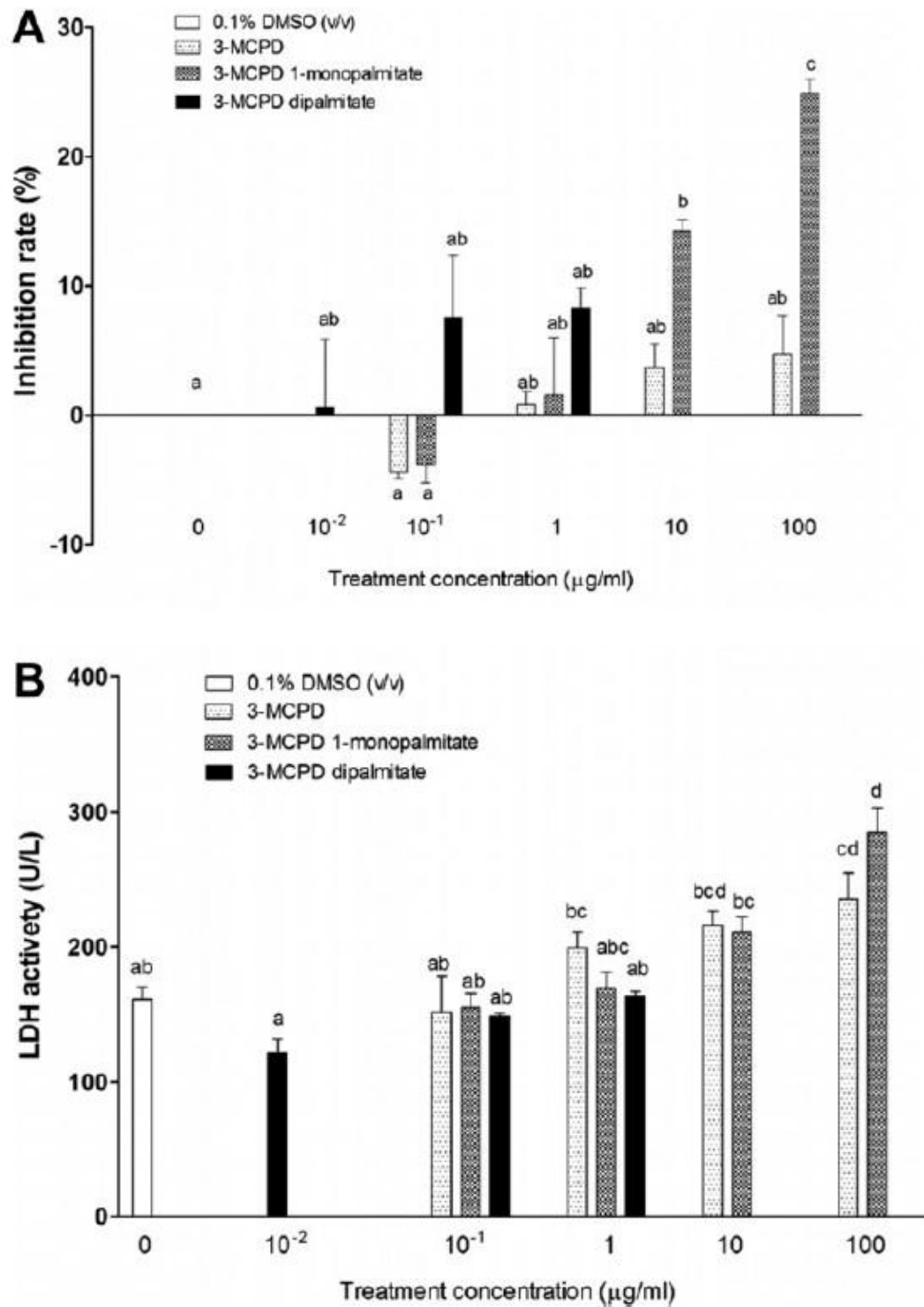


Fig. 5. Cytotoxicity of 3-MCPD 1-monopalmitate, 3-MCPD dipalmitate and 3-MCPD on NRK-52E rat kidney cells after 48 h treatment measured by MTT (A) and LDH (B) assays. Different letters represent significant differences at $P < 0.05$.

(Liu *et al.*, 2012)

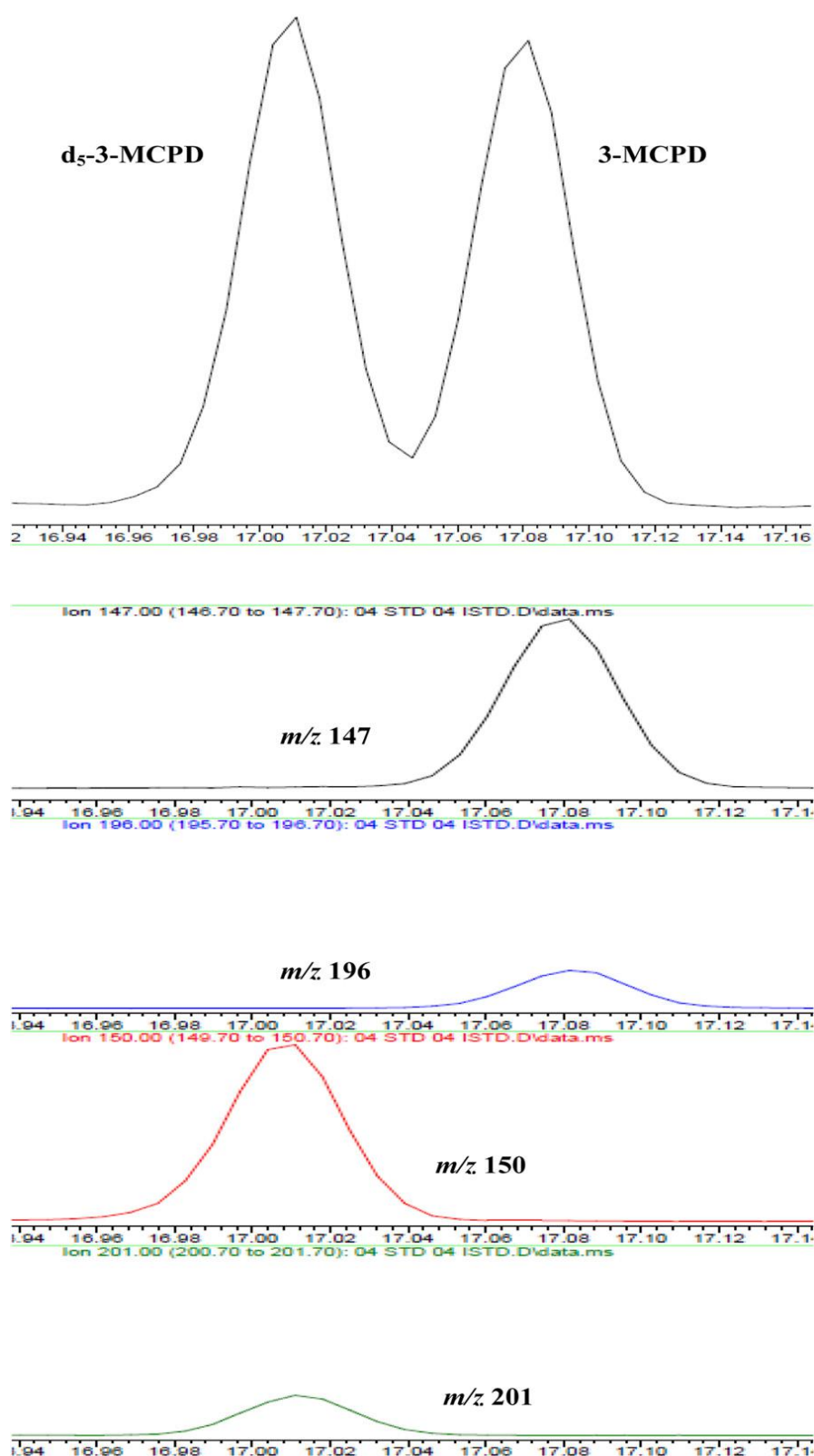


Fig. 6. GC chromatogram for the deuterated free 3-MCPD and derivatised 3-MCPD. Upper figure is the TIC for derivatised 3-MCPD. Lower figure is the extracted ion chromatogram for both 3-MCPD (m/z 147 and 196) and deuterated 3-MCPD (m/z 150 and 201).

(Razak *et al.*, 2012)

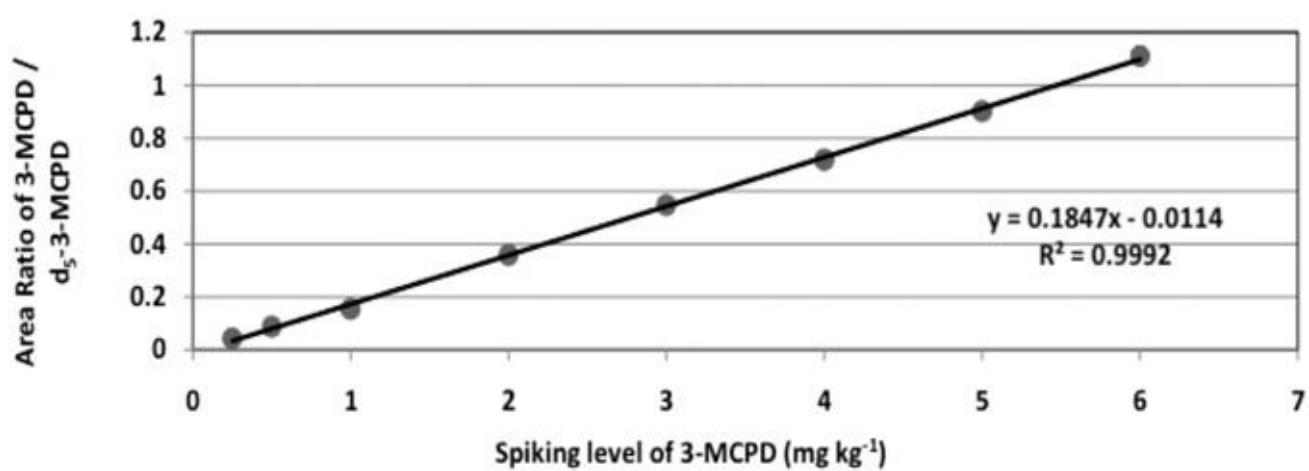


Fig. 7. Calibration curve for 3-MCPD esters in spiked blank matrix (CPO). Y-axis is the area ratio of 3-MCPD and deuterated 3-MCPD. X-axis is the spiking level of 3-MCPD (mg/kg).

(Razak *et al.*, 2012)

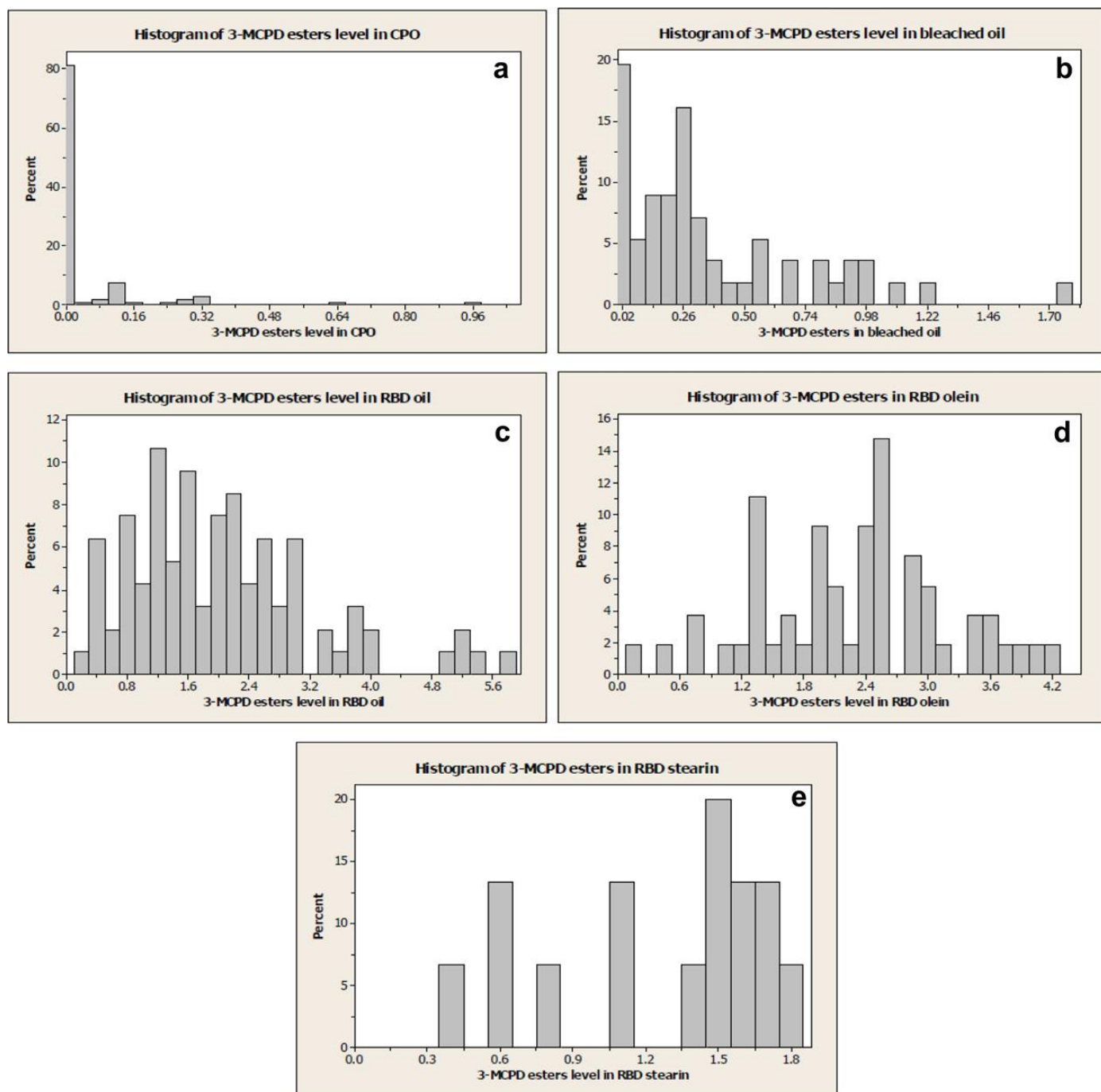


Fig. 8. Percentage distribution of 3-MCPD esters level in 324 samples of palm oil products in Malaysia. (a) CPO; (b) bleached oil; (c) RBD palm oil; (d) RBD palm olein; (e) RBD palm stearin.

(Razak *et al.*, 2012)

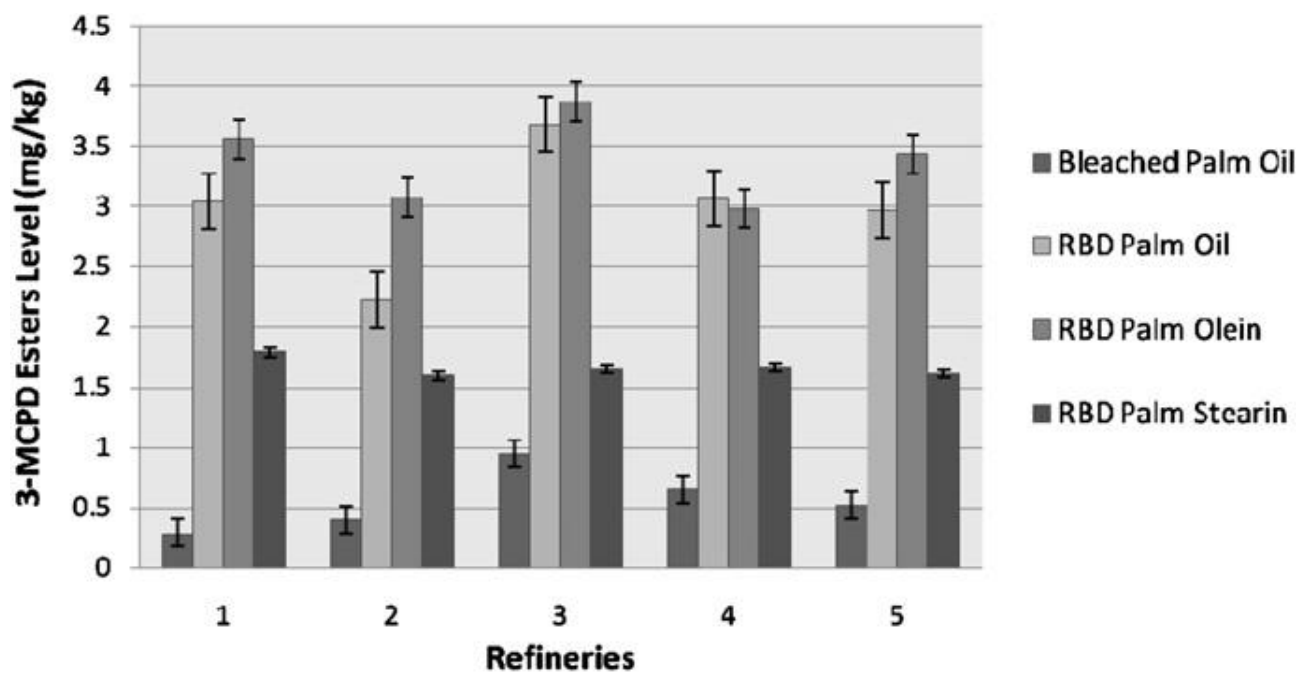


Fig. 9. 3-MCPD esters level in different type of palm oil products.

(Razak *et al.*, 2012)

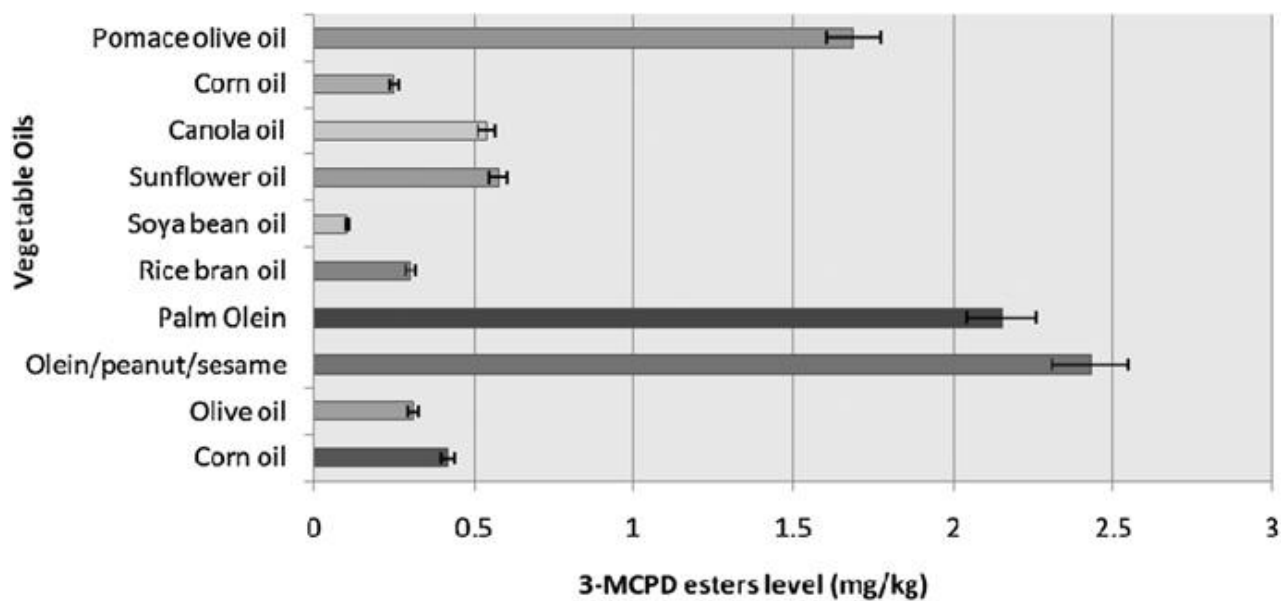


Fig. 10. 3-MCPD esters level in vegetable oils collected from the local supermarket in Malaysia.

(Razak *et al.*, 2012)

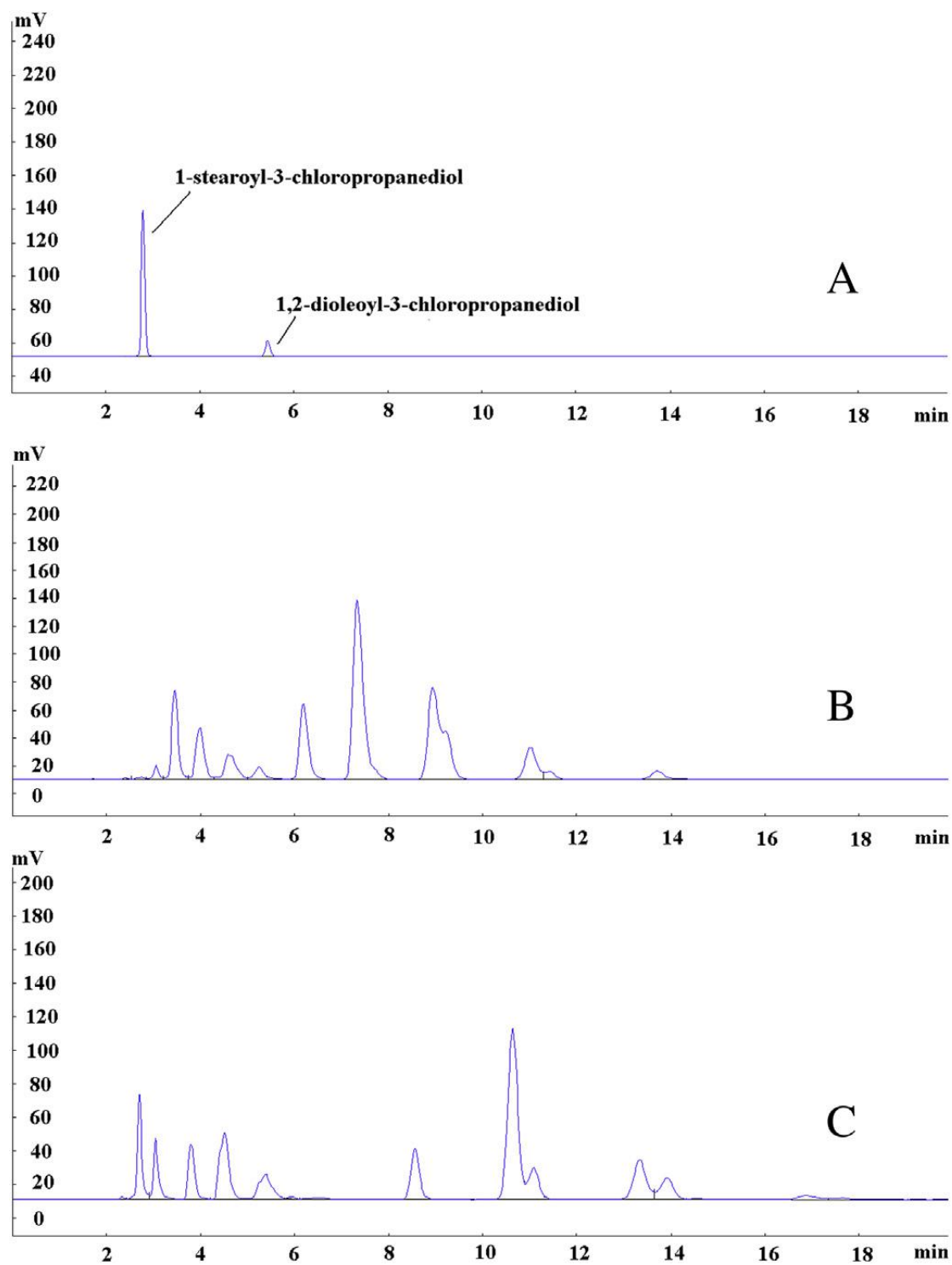


Fig. 11. Chromatograms of 3-MCPD esters standard substances acetonitrile solution, edible blending oil and grade 1 peanut oil acetonitrile extractions (A- acetonitrile solution of 3-MCPD esters standard substances, 0.2 mg/mL; B- acetonitrile extraction of edible blending oil, 250 mg/mL; C- acetonitrile extraction of grade 1 peanut oil, 250 mg/mL).

(Zhou *et al.*, 2014)

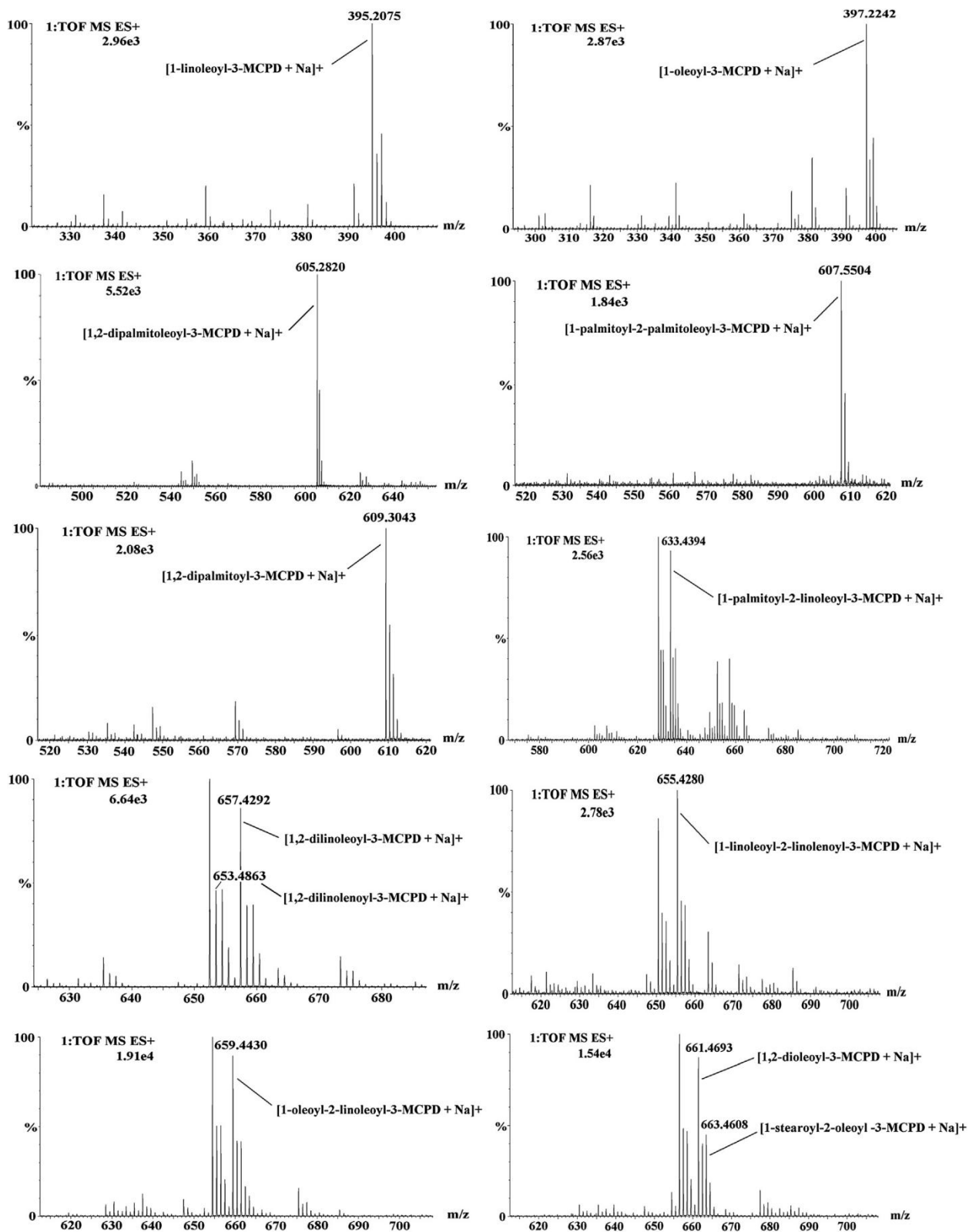


Fig. 12. Mass spectrums of self-synthesized 3-MCPD esters reference substances.

(Zhou *et al.*, 2014)

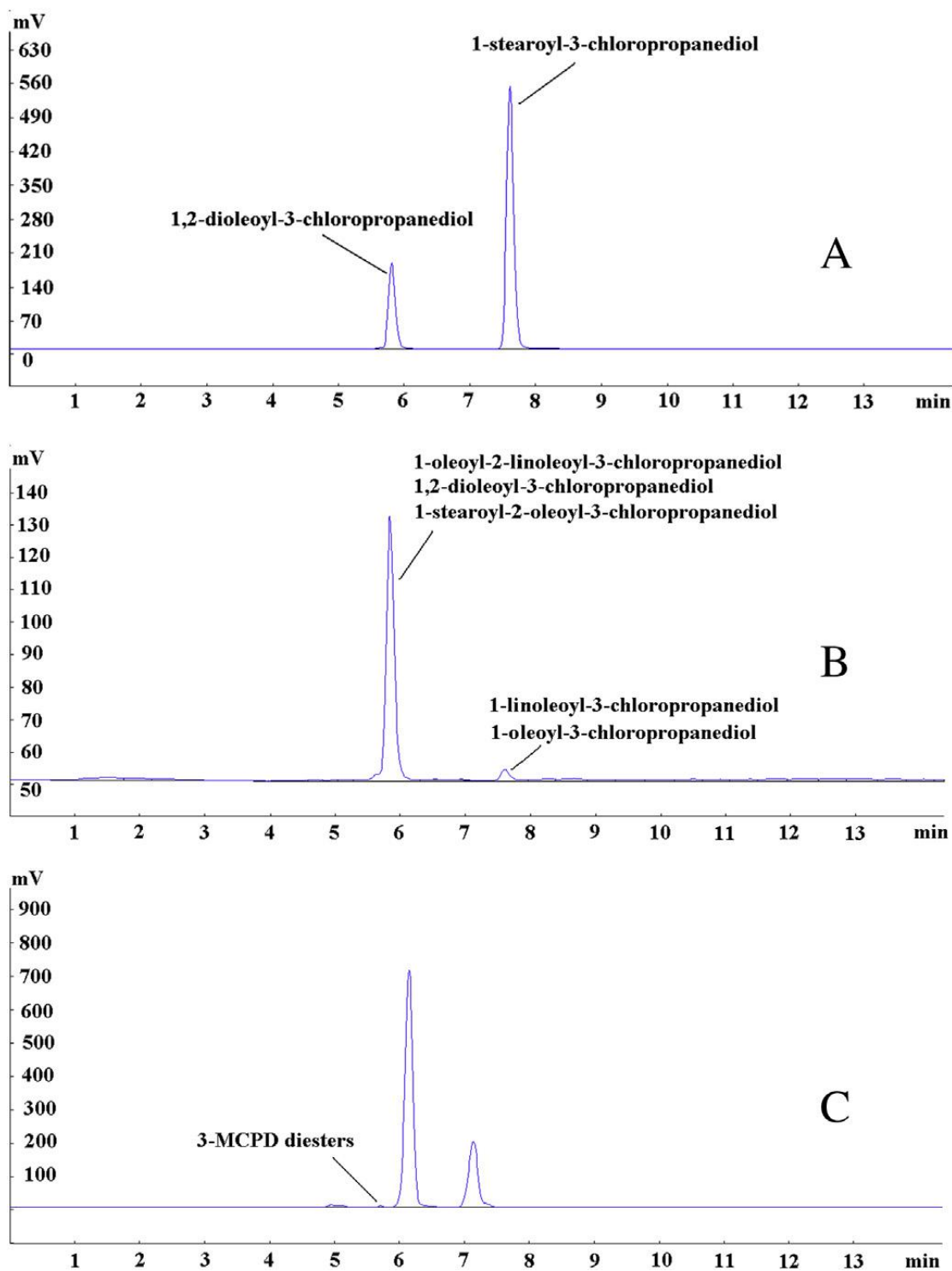


Fig. 13. Chromatograms of 3-MCPD esters standard substances, self-synthesized 3-MCPD esters reference substances and collected part of phytosterol corn oil acetonitrile extraction by SunFireC18 column (A- 3-MCPD esters standard substances, 0.2 mg/mL; B- self-synthesized 3-MCPD esters reference substances, 0.4 mg/mL; Ccollected part of phytosterol corn oil acetonitrile extraction by SunFireC18 column). (Zhou *et al.*, 2014)

Table 1. Mortality rate of Swiss mice fed 3-MCPD 1-monopalmitate.

Dose (mg/kg)	Number of dead (1)	Number of alive (2)	Total number (3)	Rate of death (1)/(3)
1000	0 (0) ^a	10 (5)	10 (5)	0
1428	0 (0)	10 (5)	10 (5)	0
2040	3 (1)	7 (4)	10 (5)	30%
2914	3 (1)	7 (4)	10 (5)	30%
4162	10 (5)	0	10 (5)	100%

^a () Number of male animals is marked in parentheses.

(Liu *et al.*, 2012)

Table 2. Absolute organ weights of dead mice in acute oral toxicity study of 3-MCPD 1-monopalmitate.

Dose (mg/kg BW)				
	Control	2040	2914	4162
Total Number	6 (3) ^a	3 (1)	3 (1)	10 (5)
BW (g)	33.36c ± 4.22	15.83a ± 1.04	14.33a ± 3.40	21.4b ± 1.99
Absolute weight (g)				
Liver	1.6941b ± 0.2733	0.8968a ± 0.1773	0.6752a ± 0.2824	1.0334a ± 0.3452
Kidney	0.2418b ± 0.0589	0.1429a ± 0.0088	0.1306a ± 0.0109	0.1705a ± 0.0235
Spleen	0.1167b ± 0.0225	0.0655ab ± 0.0422	0.0289a ± 0.0176	0.0883b ± 0.0362
Thymus	0.1334b ± 0.0224	0.0879ab ± 0.0244	0.0415a ± 0.0347	0.0979ab ± 0.0448
Testes	0.1018b ± 0.0169	–	–	0.0426a ± 0.0094
Ovaries	0.0250c ± 0.0030	0.0099a ± 0.00011	0.0061a ± 0.0016	0.0182b ± 0.0022

Data are expressed as mean ± SEM.

Different letters represent significant differences within the row ($P < 0.05$).

^a () Number of male animals is marked in parentheses.

(Liu *et al.*, 2012)

Table 3. Serum urea nitrogen (Urea) and creatinine (Cr) of mice fed 3-MCPD 1-monopalmitate.

Dose (mg/kg BW)						
	Control	1000 ^a	1428 ^a	2040 ^a	2914 ^a	4162 ^b
Number of mice	6 (3) ^c	9 (5)	10 (5)	6 (3)	7 (3)	6 (3)
Urea (mmol/L)	14.08b ± 2.27	7.83a ± 0.76	8.85ab ± 0.78	9.18ab ± 0.76	10.93ab ± 1.35	32.47c ± 9.81
Cr (μmol/L)	43.50a ± 1.64	32.89a ± 6.86	32.70a ± 7.72	29.00a ± 6.60	36.86a ± 4.30	101.33b ± 37.67

Data are expressed as mean ± SEM.

Different letters represent significant differences with the row ($P < 0.05$).

^a Parameters of survival mice after 14-day acute oral toxicity study of 3-MCPD 1-monopalmitate.

^b Parameters of dead mice exposed to 3-MCPD 1-monopalmitate.

^c () Number of males is marked in parentheses.

(Liu *et al.*, 2012)

Table 4. Effect of hydrolysis time on the area ratio of 3-MCPD and d₅-3-MCPD in spiked crude palm oil.conventional red wines.

Hydrolysis time (hour); $n = 5$	^a Mean of area ratio ($\pm$ SD)	RSD (%)
16	0.482 ($\pm$ 0.012)	2.49
18	0.507 ($\pm$ 0.01)	1.97
20	0.5032 ($\pm$ 0.008)	1.59

^a Area ratio is the ratio between the standard of 3-MCPD ($m/z = 147$) and the d₅-3-MCPD ($m/z = 150$).

(Razak *et al.*, 2012)

Table 5. Comparison between organic and conventional red wines.

Concentration (mg/kg), $n = 6$	% recovery	RSD (%)
0.25	97.6 (± 0.022)	0.02
1.0	103.8 (± 0.03)	0.03
4.0	107.7 (± 0.128)	0.12
6.0	107.9 (± 0.115)	0.11

(Razak *et al.*, 2012)

Table 6. Self-synthesized 3-MCPD esters reference substances analyzed by UPLC-Q-TOF MS.

3-MCPD esters	Molecular formula	Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)	Relative error(‰)	t _R (min)
1-Linoleoyl-3-chloropropanediol	C ₂₁ H ₃₇ ClO ₃	395.2329	395.2075	−0.0643	1.62
1-Oleoyl-3-chloropropanediol	C ₂₁ H ₃₉ ClO ₃	397.2485	397.2242	−0.0612	1.79
1,2-Dipalmitoleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₅ H ₆₃ ClO ₄	605.4313	605.2820	−0.2466	3.73
1-Palmitoyl-2-palmitoleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₅ H ₆₅ ClO ₄	607.4469	607.5504	0.1704	7.33
1,2-Dipalmitoyl-3-chloropropanediol	C ₃₅ H ₆₇ ClO ₄	609.4626	609.3043	−0.2597	3.31
1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₇ H ₆₇ ClO ₄	633.4626	633.4394	−0.0366	6.48
1,2-Dilinolenoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₆₃ ClO ₄	653.4313	653.4863	0.0842	6.10
1-Linoleoyl-2-linolenoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₆₅ ClO ₄	655.4469	655.4280	−0.0288	5.39
1,2-Dilinoleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₆₇ ClO ₄	657.4626	657.4292	−0.0508	6.10
1-Oleoyl-2-linoleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₆₉ ClO ₄	659.4782	659.4430	−0.0534	6.83
1,2-Dioleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₇₁ ClO ₄	661.4939	661.4963	0.0036	7.69
1-Stearoyl-2-oleoyl-3-chloropropanediol	C ₃₉ H ₇₃ ClO ₄	663.5095	663.4608	−0.0734	7.69

(Zhou *et al.*, 2014)

Table 7. Data obtained by HPLC method validation.

A. Precision data						
3-MCPD ester	Intraday precision (RSD%)			Interday precision (RSD%)		
	0.05 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹		0.05 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹	
1,2-dioleoyl-3-chloropropanediol	4.0	2.1		3.2	3.7	
1-stearoyl-3-chloropropanediol	2.3	2.5		4.6	5.6	
B. Accuracy data						
3-MCPD ester	Intraday accuracy (Er%)			Interday accuracy (Er%)		
	0.025 mg mL ⁻¹	0.05 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹	0.025 mg mL ⁻¹	0.05 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹
1,2-dioleoyl-3-chloropropanediol	8.6	14.6	4.3	7.3	9.6	10.2
1-stearoyl-3-chloropropanediol	4.6	7.7	11.2	5.7	12.1	9.5
C. Recovery data						
3-MCPD ester	Recovery (means % $\pm$ SD)					
	800 mg kg ⁻¹		1000 mg kg ⁻¹		1200 mg kg ⁻¹	
1,2-dioleoyl-3-chloropropanediol	106.6% $\pm$ 11.8		94.7% $\pm$ 13.3		105.8% $\pm$ 8.8	
1-stearoyl-3-chloropropanediol	91.9% $\pm$ 12.3		87.5% $\pm$ 5.3		108.6% $\pm$ 3.7	
D. Limits of detection and quantitation data						
3-MCPD ester	LOD ($S/N = 3$) (μ g mL ⁻¹)			LOQ ($S/N = 10$) (μ g mL ⁻¹)		
1,2-dioleoyl-3-chloropropanediol	3.43			5.71		
1-stearoyl-3-chloropropanediol	2.55			5.66		

(Zhou *et al.*, 2014)

Table 8. 3-MCPD esters levels in edible oils samples.

Oil sample	3-MCPD monoesters		3-MCPD diesters	
	mg/kg	RSD ^a	mg/kg	RSD
Edible vegetable blending oil	nd ^b	—	nd	—
Natural cereal blending oil	nd	—	81	3.0
Edible blending oil	nd	—	1367	3.8
Phytosterol corn oil	nd	—	73	8.3
Sunflower oil	nd	—	nd	—
Rice bran oil	nd	—	65	3.7
Rice bran oil	nd	—	122	1.1
Oil-tea camellia seed oil	nd	—	nd	—
Rice oil	nd	—	2564	4.4
Rice oil	nd	—	1449	6.2
Camellia blending oil	nd	—	nd	—
Grade 1 peanut oil	nd	—	738	1.4
Soybean oil	nd	—	58	2.7
Palm oil	nd	—	336	3.6
Palm oil	nd	—	540	1.9
Corn oil	nd	—	143	3.1
Corn oil	nd	—	132	1.5
Canola oil	nd	—	685	1.0

^a RSD = relative standard deviation (%).

^b nd = below LOD (not detected).

(Zhou *et al.*, 2014)