

平成 18 年度アクリルアミド含有実態調査で使用した分析法及び妥当性確認の結果
(乳幼児用菓子類、みそ、しょうゆ)

(1) 分析方法

(ア) 試料の調製方法

乳幼児用菓子類 (レンジケーキを除く)、みそ

1 製品の全量を粉砕・混合し、分析用試料としました。

乳幼児用菓子類のうちレンジケーキ

容器包装に記載された調理方法に従い、家庭用電子レンジで調理した後、全量を粉砕・混合し、分析用試料としました。

しょうゆ

そのまま分析用試料としました。

(イ) 分析手順

乳幼児用菓子類

分析用試料 3 g に水 100 mL、内標準物質 (アクリルアミド- d_3) 1 μ g 及びヘキサン 20 mL を加え、ホモジナイザーを用いて約 1 分間攪拌しました。

10 分間振とう後、遠心分離 (2,000 rpm、10 分間) しました。水層をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過し、ろ液 40 mL を Sep-Pak[®] C18 カートリッジ及び Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジを連結したカラムに流速 5 mL/分で通過させ、アクリルアミドを Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジに吸着させました。Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジを取り外し、窒素ガスを通気して水分を除去した後、メタノール 5 mL でアクリルアミドを溶出させました。溶出液に 10 % (w/v) ジエチレングリコールのメタノール溶液約 0.1 mL を加えて減圧濃縮後、乾固させました。

残留物をメタノール 1 mL に溶解し、5 % (w/v) キサントヒドロールのメタノール溶液 0.1 mL 及び 0.3 mol/L 塩酸のメタノール溶液 0.1 mL を加え、40 °C の水浴中で 2 時間放置し誘導体化を行いました。

反応液を減圧下乾固し、水 5 mL 及び塩化ナトリウム約 2 g を加え、酢酸エチル 2 mL で抽出し、試験溶液としました。

試験溶液 1 μ L をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) に供し、定量しました。GC/MS の条件は、表 1 のとおりです。

表 1 アクリルアミド分析における GC/MS の条件

機種	6890/5973N (Agilent Technologies, Inc.)
カラム	DB-5 (Agilent Technologies, Inc.) 0.25 mm i.d. \times 30 m, 膜厚 0.25 μ m
注入方法	スプリットレス

温度	試料導入口 250 °C カラム 40 °C(2 分保持) → 20 °C/分昇温 → 300 °C
ガス流量	ヘリウム、1 mL/分
イオン化法	EI イオン源温度 230 °C イオン化電圧: 70 eV
設定質量数 (m/z)	アクリルアミド誘導体化物: 251, 234 内標準物質誘導体化物: 254

みそ

分析用試料 10 g に水 100 mL 及び内標準物質(アクリルアミド- d_3) 2 µg を加え、ホモジナイザーを用いて約 1 分間攪拌しました。

10 分間振とう後、遠心分離 (2,000 rpm、10 分間) しました。水層を 20 mL 分取し、Extrelut[®] NT 20 に負荷後、室温にて 30 分間放置し、酢酸エチル 150 mL にて溶出させました。溶出液に 10 %(w/v) ジエチレングリコールのメタノール溶液約 0.1 mL を加えて減圧濃縮後、乾固させ、水 40 mL で残渣を溶解させました。Sep-Pak[®] C18 カートリッジ及び Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジを連結したカラムに流速 5 mL/分で通過させ、アクリルアミドを Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジに吸着させました。

これ以降の前処理・誘導体化は乳幼児用菓子類の場合と同様に操作しました。

しょうゆ

分析用試料 10 g に内標準物質 (アクリルアミド- d_3) 0.4 µg を添加し、水を加えて 20 mL に定容しました。この溶液を Extrelut[®] NT 20 に負荷しました。これ以降の前処理・誘導体化はみその場合と同様に操作しました。

(2) 妥当性確認の結果

(ア) 定量限界及び検出限界

予想される定量限界相当の濃度のアクリルアミドを含む試料 (乳幼児用菓子類 (ビスケット、米菓、ボーロ、スナック、レンジケーキ)、みそ、しょうゆ) を、それぞれ 7 回繰り返し分析したときの測定値の標準偏差から次式により算出しました。

$$\text{検出限界} = 2 \times t(n-1, 0.05) \times \text{標準偏差}$$

$$\text{定量限界} = 10 \times \text{標準偏差}$$

$t(n-1, 0.05)$: 自由度 $n-1$ のときの危険率 5%(片側)の t-分布表の値(=1.943)

表 2 検出限界及び定量限界

調査対象食品		検出限界 (mg/kg)	定量限界 (mg/kg)
乳幼児用菓子類	ビスケット類	0.005	0.020
	ウエハース	0.005	0.020
	米菓	0.005	0.020
	ボーロ	0.005	0.020
	スナック類	0.005	0.020
	レンジケーキ	0.005	0.020
みそ	米みそ	0.005	0.020
	麦みそ	0.005	0.020
	豆みそ	0.005	0.020
しょうゆ	こいくちしょうゆ	0.002	0.004
	うすくちしょうゆ	0.002	0.004
	しろしょうゆ	0.002	0.004

(イ) 標準添加回収率

試料（乳幼児用菓子類（ビスケット、米菓、ボーロ、スナック、レンジケーキ）、みそ、しょうゆ）に、表 3 に示した 2 濃度に相当する量のアクリルアミド標準液を添加し、それぞれの濃度で 3 回分析し、それぞれの濃度における回収率及び標準偏差（SDr）を算出しました。その結果、回収率が分析法の性能規準に関する国際的なガイドラインに示されている値を概ね満たしていることを確認しました。

表 3 標準添加回収試験の結果

調査対象食品	添加濃度 (mg/kg)	回収率の範囲(%)	平均回収率 (%)	回収率の標準 偏差(SDr)
乳幼児用菓子類				
ビスケット類	0.02	98 - 110	104	5.7
	3.9	101 - 110	105	4.8
ウエハース	0.07	99 - 106	102	3.4
	1.7	107 - 111	109	2.2
米菓	0.02	91 - 106	98	7.6
	2.7	99 - 104	102	2.3
ボーロ	0.02	104 - 119	113	7.2
	0.39	100 - 103	101	1.7

調査対象食品	添加濃度 (mg/kg)	回収率の範囲(%)	平均回収率 (%)	回収率の標準 偏差(SDr)
スナック類	0.02	90 – 95	93	2.4
	5.0	110 – 111	111	0.4
レンジケーキ	0.02	107 – 117	113	4.4
	0.16	100 – 106	103	3.0
みそ	0.02	95 – 103	100	4.2
	0.10	96 – 100	97	2.2
しょうゆ	0.005	100 – 106	103	2.9
	0.025	98 – 101	99	1.7

(ウ) 測定の不確かさ

各調査品目について、表 4 に示した 2 濃度のアクリルアミドを含む試料を、それぞれ 7 回繰り返し試験し、併行精度(RSDr)を算出しました。その結果、RSDr は、分析法の性能基準に関する国際的なガイドラインに示されている値を満たしていることを確認しました。

表 4 繰り返し試験から算出した併行精度 (RSDr)

調査対象食品	試料中の濃度(mg/kg)	RSDr(%)
乳幼児用菓子類		
ビスケット	0.12	5.1
	0.45	4.6
ウエハース	0.089	4.7
	0.32	2.7
米菓	0.02	4.0
	0.47	2.0
ボーロ	0.02	3.8
	0.08	3.1
スナック類	0.023	5.0
	0.90	6.0
レンジケーキ	0.028	4.3
	0.19	4.2
みそ	0.02	4.9
	0.10	4.6
しょうゆ	0.006	5.1
	0.026	3.0