

平成 22 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
(小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品、含みつ糖を含む加工食品)

(1) 分析方法

(ア) 試料の調製方法

1 製品の全量をホモジナイザーで粉砕・混合して均質化したものを分析用試料としました。

(イ) 分析手順

小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品

分析用試料 1 g に、10 µg/mL の内標準物質 (アクリルアミド 1,2,3-¹³C₃) 標準溶液 50 µL、水 15 mL、ヘキササン 20 mL 及び NH₂ パウダー 1.5g を加え、10 分間激しく振とう後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) しました。

マニホールドを用い、水層を、Sep-Pak[®] tC18 カートリッジと Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジを連結したカラム (予め水 15 mL、メタノール 15 mL、水 15 mL でコンディショニングしたもの) に負荷し、水 15 mL で洗浄し、1 分間乾燥しました。

メタノール 15 mL でアクリルアミドを溶出させ、溶出液を 0.5 mL 以下になるまで減圧濃縮 (40°C 以下) した後、超純水で洗いながら 1 mL に定容し、試験溶液としました。

試験溶液 10 µL を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) に供し、定量しました。LC/MS/MS の条件は、表 1-1 のとおりです。

表 1-1 アクリルアミド分析における LC/MS/MS の条件

機種	LC: ACQUITY UPLC システム (Waters) MS/MS: 3200 Q Trap (Applied Biosystems)
HPLC カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters) 2.1 mm i.d. × 100 mm, 粒径 1.7 µm
カラム温度	55 °C
移動相	Solvent A: 5 mM 酢酸アンモニウム Solvent B: メタノール グラジエント 0 分 A/B (90/10) → 3 分 A/B (90/10) → 6 分 A/B (0/100) → 14 分 A/B (0/100)
流速	0.15 mL/分

MS/MS	イオン化法:ESI (ポジティブ) イオンスプレー電圧:5500V イオン源温度:300 °C カーテンガス : 20.00 コリジョンガス : 3.00 ネブライザーガス:70.00 PSI ターボ(AUX)ガス:80.00 PSI デクラスタリング電位:51 V(アクリルアミド)、46 V(内標準物質) コリジョンエネルギー:15 V(アクリルアミド、内標準物質) 27 V(アクリルアミド確認イオン) 25 V(内標準物質確認イオン)
設定質量数 (m/z)	アクリルアミド:72.1、55.0 (定量イオン) 72.1、44.1 (確認イオン) 内標準物質: 75.07、58.1 (測定イオン) 75.07、45.1 (確認イオン)

含みつ糖を含む加工食品

分析用試料 2.0 g に 100 µg/mL の内標準物質 (アクリルアミド-1-¹³C) 標準溶液 20 µL 及び水 40 mL を加え、ホモジナイザーを用いて約 2 分間攪拌しました。

遠心分離 (2,600 rpm、10 分間) した上澄み液を、共栓付メスシリンダーに移し、水で 40 mL とし、このうち 20 mL (試料 1.0 g 相当) を 50 mL の共栓付遠沈管にとり、ヘキサン 10 mL を加え 5 分間振とう洗浄 (2 回) を行いました (エマルジョンが生じた場合には 3,000 rpm で 5 分間遠心分離)。

5 mol/L 硫酸を用いて pH 1 以下とし、臭化カリウム 10 g を加えて完全に溶解したのち、0.1 mol/L 臭素酸カリウム溶液 6 mL を加え、よく混合してから冷蔵庫 (4~10°C) 中で 90 分間静置しました。

臭素化後の溶液に 1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液を臭素の黄褐色が消失するまで加え、過剰の臭素を分解しました。酢酸エチル 10 mL を加え 5 分間振とう抽出をする操作を 2 回行いました (エマルジョンが生じた場合には 3,000 rpm で 5 分間遠心分離)。

抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮して酢酸エチルを留去しました。残留物を 10%アセトン含有ヘキサン約 2 mL で溶解し、Sep-Pak® PLUS フロリジルカートリッジ (予めヘキサン 10 mL で洗浄したもの) に負荷しました。濃縮容器を 10%アセトン含有ヘキサン 1 mL ずつを用いて 2 回洗浄し、その洗液を当該カラムに負荷しました。カラムを 10%アセトン含有ヘキサン 6 mL で洗浄した後、20%アセトン含有ヘキサン 15 mL で溶出した流下液を減圧濃縮後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去しました。残留物にアセトン 0.5 mL 及

びトリエチルアミン 20 μL を加えて脱臭化水素し、試験溶液としました。

試験溶液 2 μL 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 1-2 のとおりです。

表 1-2 アクリルアミド分析における GC/MS の条件

機種	GCMS-QP2010 Plus (島津製作所)
カラム	TC-WAX (J&W Scientific) 0.25 mm i.d. \times 30 m, 膜厚 0.25 μm ガードカラム: 不活性化キャピラリー (J&W Scientific) 0.25 mm i.d. \times 2 m
注入方法	スプリットレス
温度	試料導入口 250 $^{\circ}\text{C}$ カラム 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 分保持) \rightarrow 15 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 昇温 \rightarrow 240 $^{\circ}\text{C}$ (11.3 分) トランスファーライン温度 240 $^{\circ}\text{C}$
ガス流量	ヘリウム、1 mL/分
イオン化法	EI 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: 149, 151 内標準物質誘導体化物: 150, 152

(2) 妥当性確認の結果

(ア) 検出限界及び定量限界

小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品

アクリルアミド標準液を定量限界付近の濃度となるよう添加した空試験により、3 回繰り返し測定をしたときの標準偏差から次式により算出しました。

検出限界=3 \times 標準偏差

定量限界=10 \times 標準偏差

含みつ糖を含む加工食品

アクリルアミド標準液無添加の空試験により、7 回繰り返し測定をしたときの標準偏差と検量線の傾きから次式により算出しました。

検出限界=3 \times 標準偏差 \times 検量線の傾き

定量限界=10 \times 標準偏差 \times 検量線の傾き

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)
穀類加工品		
小麦系、野菜系スナック	0.002	0.005
シリアル食品	0.002	0.005
含みつ糖を含む加工食品		
飴	0.005	0.02
まんじゅう	0.008	0.03
ロールパン	0.007	0.02
かりんとう	0.008	0.03

(イ) 標準添加回収率

小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品

低濃度域の添加回収試験については、表 3-1 に示した濃度に相当する量のアクリルアミド標準液を添加した空試験により、中間濃度域の添加回収試験については、試料（小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品）に、表 3-1 に示した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満たしていることを確認しました。

表 3-1 標準添加回収試験の結果 1

調査対象食品	添加濃度 (mg/kg)	回収率の範囲(%)	平均回収率(%)	SDr
空試験	0.03 0	100 - 106	102	3.1
小麦系、野菜系スナック	0.50	92 - 97	95	2.8
シリアル食品	0.50	94 - 95	94	0.61

含みつ糖を含む加工食品

試料（飴、まんじゅう、ロールパン、かりんとう）に、表 3-2 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 7 回の繰り返し試験を異なる 3 日間で実施し、それぞれの濃度における回収率及び標準偏差 (SDi) 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 3-2 標準添加回収試験の結果 2

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(SDi)
飴	0.030	90 - 96	93	1.8
	1.0	101 - 105	104	0.72
まんじゅう	0.030	101 - 115	106	3.7
	1.0	103 - 105	104	0.72
ロールパン	0.030	107 - 119	114	2.5
	1.0	103 - 105	104	0.64
かりんとう	0.030	106 - 117	111	3.5
	1.0	103 - 105	104	0.40

(ウ) 測定の不確かさ

小麦系スナック、野菜系スナック、シリアル食品

低濃度域については、表 4-1 に示した濃度に相当する量のアクリルアミド標準液を添加した空試験について、高濃度域については、表 4-1 に示したアクリルアミド濃度を含む試料について、それぞれ 7 回の繰り返し試験を異なる 3 日間で実施し、一元配置分散分析により室内再現精度 (RSD_i) を算出しました。

その結果、RSD_i 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 4-1 繰り返し試験から算出した室内再現精度 (RSD_i)

調査対象食品	添加濃度(mg/kg)	RSD _i (%)
空試験	0.030	7.0
小麦系、野菜系スナック	0.50	2.8
シリアル食品	0.50	3.2

含みつ糖を含む加工食品

試料 (飴、まんじゅう、ロールパン、かりんとう) に、表 4-2 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たものについて、それぞれ 7 回の繰り返し試験を異なる 3 日間で実施し、室内再現精度 (RSD_i) を算出しました。

その結果、RSD_i 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 4-2 繰り返し試験から算出した室内再現精度 (RSDi)

調査対象食品	添加濃度(mg/kg)	RSDi(%)
飴	0.030	1.9
	1.0	0.5
まんじゅう	0.030	4.1
	1.0	0.69
ロールパン	0.030	2.8
	1.0	0.65
かりんとう	0.030	3.4
	1.0	0.40