

平成 26 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
(ビスケット類、米菓、乳幼児用菓子類、麦茶(煎り麦)、ほうじ茶(茶葉)、
レギュラーコーヒー(豆)、インスタントコーヒー(固形)、レトルトカレー、
焼麩及び揚げ麩、種実類加工品、和生・半生菓子、洋生・半生菓子、
天ぷら、揚げ物類(天ぷらを除く)、お好み焼き・たこ焼き)

(1) 分析方法

(ア) 試料の調製方法

1 製品の全量をフードプロセッサー、ホモジナイザー等の適切な器具を用いて粉砕、混合し、均質化したものを分析用試料としました。冷凍品及びチルド品については、製品の包装の記載に従って解凍又は調理した後に上記と同様に調製しました。また、レトルトカレーは、製品の包装に記載されている加熱時間に従い湯せんで温めた後、ふるい又はピンセットを用いてソース部分と具部分に分離した上で、それぞれ全量を上記と同様に調製しました。

なお、殻付きの種実類加工品は殻を除いて調製しました。殻を除いた後の種実又は製品そのものが薄皮(渋皮)に覆われている場合、薄皮を除かずに調製しました。

(イ) 分析方法

ビスケット類、米菓、乳幼児用菓子類、麦茶(煎り麦)、ほうじ茶(茶葉)、 レギュラーコーヒー(豆)、インスタントコーヒー(固形)、レトルトカレー

分析用試料 1.0 g に内標準物質(1,2,3-¹³C₃: 1 mg/mL メタノール溶液) 50 µL 及び 0.1%ギ酸 1 mL、水 9 mL を加え、振とう機で 20 分間振とうさせた後、遠心分離(3,000 rpm、5 分間)し、遠心上清の中間層より 2 mL 以上を分取しました。

固相カラム HLB(あらかじめメタノール 3.5 mL、水 3.5 mL でコンディショニングしたもの。)に先程得られた溶液 1.5 mL を負荷した後、水 0.5 mL でカートリッジを洗浄し、続けて、水 1.5 mL で溶出を行いました。

固相カラム AccuCAT(あらかじめメタノール 2.5 mL、水 2.5 mL でコンディショニングしたもの。)に先程抽出した溶液 0.5 mL を負荷し、その溶出液を捨てました。その後、先程抽出した溶液の残りの溶液を負荷し、溶出液を回収した後、メンブランフィルターに通し、試料溶液としました。

この試料溶液を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析(LC-MS/MS)に供し、定量しました。LC-MS/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 LC-MS/MS の条件

機種	API-4000 (AB SCIEX)
----	---------------------

HPLC カラム	Atlantis dC18 (Waters) 2.1 mm i.d. × 150 mm 粒径 3 μm
カラム温度	40 °C
移動相	酢酸/メタノール/水 (1/5/1000)
流量	0.2 mL/min
MS/MS	イオン化法 : ESI (ポジティブ) Ion Spray Voltage : 5500 V Temperature : 600 °C Declustering Potential : アクリルアミド : 51 V 内標準物質 : 46 V コリジョンエネルギー : アクリルアミド : 17 V 内標準物質 : 17 V
設定質量数 (m/z)	アクリルアミド : 72 (定量イオン)、55 (確認イオン) 内標準物質 : 75 (定量イオン)、58 (確認イオン)

焼麩及び揚げ麩、種実類加工品、和生・半生菓子、洋生・半生菓子

分析用試料 1.0 g に内標準物質 (0.2 μL アクリルアミド安定同位体 0.1%ギ酸溶液) 1 mL、水 9 mL を加え、20 分間振とう抽出を行った後、遠心分離 (9,000 rpm、15 分間) し、水層を 5 mL 分取しました。水層が混濁している場合には、分取した溶液 5 mL を限外ろ過チューブを用いてさらに遠心分離 (9,000 rpm、3 分間) を行いました。

Oasis HLB カートリッジ (あらかじめメタノール 3.5 mL、水 3.5 mL を順次コンディショニングしたもの。) に先程得られた溶液 1.5 mL を負荷した後、水 0.5 mL でカートリッジを洗浄し、続けて、水 1.5 mL で溶出を行いました。

Bond Elut Accucat カートリッジ (あらかじめメタノール 2.5 mL、水 2.5 mL を順次コンディショニングしたもの。) に上記溶出液を 1.5 mL 負荷させ、液面が固相 1 mL の位置に下がるまでの溶出液を捨て、その後の溶出液 0.5 mL を集め、これを試料溶液としました。

この試料溶液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 2 のとおりです。

表 2 アクリルアミド分析における LC-MS/MS の条件

機種	API-4000 (AB SCIEX)
HPLC カラム	Inertsil ODS-3 (GL Sciences, Inc) 2.1 mm i.d. × 100 mm 粒径 3 μm
カラム温度	40 °C

(2) 妥当性確認の結果

(ア) 検出限界及び定量限界

ビスケット類、米菓、乳幼児用菓子類、麦茶（煎り麦）、ほうじ茶（茶葉）、レギュラーコーヒー（豆）、インスタントコーヒー（固形）、レトルトカレー

試料（乳幼児用米菓、ほうじ茶（茶葉）、レトルトカレー（ルー及び具））に、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、7回繰り返し測定を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。なお、ビスケット類、米菓、乳幼児用菓子類は、乳幼児用米菓を用いて算出した値を、麦茶（煎り麦）、レギュラーコーヒー（豆）、インスタントコーヒー（固形）は、ほうじ茶（茶葉）を用いて算出した値を、それぞれの検出限界及び定量限界としました。

検出限界=3×標準偏差

定量限界=10×標準偏差

焼麩及び揚げ麩、種実類加工品、和生・半生菓子、洋生・半生菓子、天ぷら、揚げ物類（天ぷらを除く）、お好み焼き・たこ焼き

アクリルアミド標準液を、検出限界又は定量限界として設定する濃度に調製し、これらを測定したときのシグナル（S）のノイズ（N）に対する比が、次の値以上であることを確認しました。

検出限界：3（S/N の値）

定量限界：10（S/N の値）

表 4 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)
ビスケット類、米菓、 乳幼児用菓子類	0.0027	0.0091
麦茶（煎り麦）、ほうじ茶（茶葉）、 レギュラーコーヒー（豆）、 インスタントコーヒー（固形）	0.0064	0.021
レトルトカレー（ルー）	0.0011	0.0036
レトルトカレー（具）	0.0014	0.0047
焼麩及び揚げ麩、種実類加工品、 和生・半生菓子、洋生・半生菓子	0.010	0.030
天ぷら、揚げ物類（天ぷらを除く）、 お好み焼き・たこ焼き	0.005	0.01

(イ) 標準添加回収率

試料（乳幼児用米菓、ほうじ茶（茶葉）、レトルトカレー（ルー及び具）、ピーナッツ、どらやき、小町麩、天ぷら、お好み焼き）に、表 5 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、それぞれ同表に示した回数分析して回収率を算出しました。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 5 標準添加回収試験の結果

調査対象食品	添加濃度 (mg/kg)	試験数	回収率の範囲 (%)	平均回収率 (%)
乳幼児用米菓	0.02	3	97 - 108	102
	2.5	3	101 - 105	103
ほうじ茶（茶葉）	0.03	3	97 - 107	102
	2.5	3	107 - 109	109
レトルトカレー （ルー）	0.01	3	99 - 104	101
	2.5	3	107 - 109	108
レトルトカレー （具）	0.01	3	94 - 108	101
	2.5	3	106 - 108	107
ピーナッツ	0.03	18	104 - 119	112
	0.5	18	97 - 101	99
どらやき	0.03	18	87 - 112	103
	0.5	18	99 - 103	101
小町麩	0.03	18	76 - 120	98
	0.5	18	100 - 108	101
天ぷら	0.01	21	89 - 120	106
	5	21	98 - 102	100
お好み焼き	0.01	21	80 - 101	91
	5	21	92 - 102	99

(ウ) 測定の不確かさ

試料（乳幼児用米菓、ほうじ茶（茶葉）、レトルトカレー（ルー及び具）、ピーナッツ、どらやき、小町麩、天ぷら、お好み焼き）に、アクリルアミド標準液を添加し、表 6 に示した 2 濃度に相当する量のアクリルアミドを含む試料を調製し、それぞれ 7 回の繰り返し試験を異なる 3 日間に実施し、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 6 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	濃度(mg/kg)	RSD _i (%)
乳幼児用米菓	0.05	2.1
	2.5	2.1
ほうじ茶 (茶葉)	0.25	1.5
	3	1.2
レトルトカレー (ルー)	0.01	5.2
	2.5	1.0
レトルトカレー (具)	0.01	6.0
	2.5	1.9
ピーナッツ	0.03	7.3
	0.5	4.1
どらやき	0.02	11.7
	0.2	4.3
小町麩	0.03	3.5
	0.2	8.2
天ぷら	0.01	7.4
	5	1.6
お好み焼き	0.01	11.0
	5	3.0