

平成25年度遊離アスパラギン含有実態調査で使用した分析法及び妥当性確認の結果

1. 分析

- A) 小麦を原料とする穀粉（うち、薄力粉・中力粉・全粒粉薄力粉・全粒粉中力粉）、小麦以外の麦類を原料とする穀粉（大麦粉・麦こがし・全粒粉ライ麦粉・ライ麦粉）、米を原料とする穀粉（玄米粉、胚芽米粉、精米粉、上新粉、白玉粉、道明寺粉、米ぬか）、その他の穀粉（そば粉・トウモロコシ粉・片栗粉）

(ア)試料の調製方法

1 製品のうち 100 g 以上を必要に応じてフードミルで粉碎混合して均質化したものを分析用試料としました。

(イ)分析法

分析用試料 1.0 g を 200 mL のナスフラスコに取り、これに 20 mL の蒸留水を加えて、80°Cの水浴上で 20 分間加熱後、エタノール 60 mL を加えてさらに 80°Cで 10 分間加熱し、JIS P3801 の No.2 ろ紙でろ過しました。残渣に 75%エタノール溶液 20 mL を加え 80°Cで 10 分間抽出した後に、No.2 ろ紙でろ過し、ろ液を合わせました。冷却後 75%エタノールを用いて 100 mL に定容し、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液としました。

試料溶液 10 μL を分取し LC-MS を用いて定量しました。LC-MS の条件は表 1-1 のとおりです。

表 1-1 アスパラギン分析における LC-MS の条件

機種	API-2000 (Applied Biosystems)
カラム	Intrada Amino Acid 3 mm i.d.×100 mm (Imtakt)
カラム温度	40°C
移動相	Solvent A: アセトニトリル-テトロヒドロフラン-25 mM ギ酸アンモニウム-ギ酸 (10:75:15:0.3) Solvent B: アセトニトリル-100 mM ギ酸アンモニウム(20:80) グラジエント 0 分 A/B(100/0) → 5 分 A/B(100/0) → 15 分 A/B(0/100) → 25 分 A/B(0/100)
流量	0.2 mL/分
MS	イオン化法 : Turbospray (ESI ポジティブ) 測定チャンネル : 132.97 {M+H} / 74.10 (CE=23V) 87.10 (CE=15V) 115.90 (CE=15V) 46.10 (CE=33V)

B) 小麦を原料とする穀粉（準強力粉、強力粉、全粒粉準強力粉、全粒粉強力粉、小麦胚芽、小麦ふすま、小麦以外の麦類を原料とする穀粉（オートミール、オートブラン、麦芽粉末）

(ア) 試料の調製方法

1 製品のうち 100 g 以上を必要に応じてフードミルで粉碎混合して均質化したものを分析用試料としました。

(イ) 分析法

分析用試料 2 g を 50 mL の遠沈管に取り、これに蒸留水約 15 mL を加えて、タッチミキサーで混合した後、10 分間超音波処理しました。振とう機で 10 分間振とうした後、蒸留水を用いて遠沈管の目盛りで 20mL に定容した後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。上澄み液 1 mL と 5%トリクロロ酢酸溶液 1 mL を 2 mL のマイクロチューブにとり、緩やかに転倒混和した後に 10,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを試料溶液としました。

試料溶液 20 μ L を分取し、高速アミノ酸分析計を用いて定量しました。高速アミノ酸分析計の条件は表 1 - 2 のとおりです。

表 1-2 アスパラギン分析における高速アミノ酸分析計の条件

機種	高速アミノ酸分析計 L-8800A (日立ハイテクノロジーズ)									
カラム	メインカラム：生体液分析カラム#2622PF (855-3507)、 φ 4.6×60 mm (日立ハイテクノロジーズ) アンモニアフィルタカラム：アンモニアカラム (855-3523), φ 4.6×40 mm (日立ハイテクノロジーズ)									
移動相	ポンプ 1 : L-8500 形日立高速アミノ酸分析計用緩衝液 (PF-1, PF-2, PF-3, PF-4, PF-RG) ポンプ 2 (試薬) : ニンヒドリン溶液(NIN), 緩衝液(Buffer), 5%エタノール溶液(EtOH) グラジエント条件									
	時間 (分)	ポンプ 1					カラム 温度 (°C)	ポンプ 2		
		PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	PF-RG		NIN (%)	Buffer (%)	5% EtOH (%)
	0	100	0	0	0	0	38	50	50	0
	2						30			
	21.5	100	0	0	0	0				
	21.6	80	20	0	0	0	60			
	33.5	70	30	0	0	0				
	33.6	0	0	0	0	100	70			
	37							50	50	0
	37.1							0	0	100
	42.5	0	0	0	0	100				
	42.6	100	0	0	0	0				
	46						38			
	47							0	0	100
	47.1							50	50	0
	69	100	0	0	0	0				
流量	ポンプ 1 : 0.35 mL/分 ポンプ 2 : 0.30 mL/分									
測定波長	570 nm									

2. 妥当性確認の結果

(1) 検出限界及び定量限界

目標とする定量限界（10 mg/kg）付近の濃度の試料を選び、7回繰り返し試験をした時の測定値から、次式を用いて検出限界及び定量限界を算出しました。それぞれの分析法の検出限界、定量限界は表2のとおりです。

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

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

* $t(n-1, 0.05)$; 自由度 $n-1$ のときの危険率 5 % (片側) の t -分布表の値 ($n=7$ の場合 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)
A) 小麦を原料とする穀粉（うち、薄力粉・中力粉・全粒粉薄力粉・全粒粉中力粉）、 小麦以外の麦類を原料とする穀粉（大麦粉・麦こがし・全粒粉ライ麦粉・ライ麦粉）、 米を原料とする穀粉（玄米粉、胚芽米粉、精米粉、上新粉、白玉粉、道明寺粉、米ぬか）、 その他の穀粉（そば粉・トウモロコシ粉・片栗粉）	7	20
B) 小麦を原料とする穀粉（準強力粉、強力粉、全粒粉準強力粉、全粒粉強力粉、小麦胚芽、小麦ふすま）、 小麦以外の麦類を原料とする穀粉（オートミール、オートブラン、麦芽粉末）	4	10

(2) 標準添加回収率

各試料（薄力粉、精米粉、強力粉）に、表3に示した濃度のアスパラギン標準液を添加し、それぞれの濃度で3回以上分析し、それぞれの濃度における回収率及び併行相対標準偏差（RSD_r）を算出しました。その結果、回収率が分析法の性能基準に関する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 (%)	回収率の併行相 対標準偏差 (RSDr) (%)
薄力粉	10	80-100	98	13.3
	1000	96-103	99	3.5
精米粉	10	100-110	99	5.8
	1000	79- 86	82	5.0
強力粉	3	71- 91	85	9.3

(3) 測定の不確かさ

表 4 に示した濃度のアクリルアミドが含まれる試料（薄力粉、精米粉、強力粉）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 (RSDi) を算出しました。

表 4 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	試料中の濃度 (mg/kg)	RSDi (%)
薄力粉	21	7.4
	92	3.0
米粉	12	14
	38	5.2
強力粉	4.5	4.6
	28	4.6