

平成30年3月16日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：2701-2

アクリルアミド濃度の目安となる指標等の開発（穀類中の遊離アスパ
ラギンの分析法プロトコルの開発）

研 究 期 間：平成27年度～平成29年度（3年間）

研究総括者名：藤田 和弘

試験研究機関名：一般財団法人日本食品分析センター

1 研究目的

アクリルアミド (AA) は、食品を主に低水分下において 120℃以上で加熱した際にアミノ酸の一種である遊離アスパラギンと還元糖が化学反応し、意図せずに生成することが知られている。AA は、神経毒性及び動物実験での遺伝毒性発がん性が報告されていることから、食品を通じて長期間 AA を摂取し続けることでヒトの健康に悪影響を及ぼすことが懸念される。このため、食品中の AA をできる限り低減するための取組みが国際的に進められている。

AA 前駆体 (アスパラギン、還元糖) 濃度の低い原料の使用の可能性を検討する上では、AA 前駆体濃度を知る必要があり、そのためには分析法が不可欠である。しかしながら、現時点で、穀類中の遊離アスパラギンの分析法に関し、妥当性が確認された標準的な手順として、誰でも参照できるものはない。そこで、信頼性の高い分析法プロトコルを作成して、食品関連事業者が自由に参照できるようにすることが重要である。

本研究では、①HPLC-UV 又は LC-MS(MS)を用い、定量限界が 20 mg/kg 以下を満たす、穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルを開発する。なお、分析法プロトコルは食品関連事業者にとってわかりやすいものとなるようする。また、②開発した方法について単一試験室による妥当性評価及び複数試験室での試験室間における妥当性評価を実施し、開発した方法が、コーデックス委員会が”Principles for the Establishment of Codex methods of Analysis”で定める分析法の性能基準 (以下「コーデックス委員会が定める性能基準」) を満たすことを目標とする。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題 1 : HPLC-UV による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発

定量限界を 20 mg/kg 以下とする分析法の開発を行う。

- ・小課題 1 : 小麦粉等の比較的高濃度の遊離アスパラギンを含有している試料及び遊離アスパラギンの濃度が低い片栗粉等の試料を用いて、スルホサリチル酸等による抽出法を検討する。
- ・小課題 2 : アスパラギンのアミノ基をターゲットにダンシルクロライド等により誘導体化を行い、C18 カラムを用いた分離条件を検討する。
- ・小課題 3 : 必要であれば、イオン交換カートリッジ等の固相抽出を用いて前処理法を検討する。

2) 中課題 2 : LC-MS(MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発

定量限界を 20 mg/kg 以下とする分析法の開発を行う。

- ・小課題 1 : HPLC-UV 法と同様に小麦粉等の比較的高濃度の遊離アスパラギンを含有している試料及び遊離アスパラギンの濃度が低い片栗粉等の

試料を用いて、スルホサリチル酸等による抽出法を検討する。

- ・小課題 2：アスパラギンを誘導体化せずに、PFP (Penta Fluoro Phenyl) カラム等の HILIC 系カラムを用いた分離条件を検討する。なお、LC-MS 又は LC-MS/MS のイオン化法は ESI とし、最適なイオン化条件と試料マトリックスとの分離条件を確立する。また、必要であれば安定同位体を内標準として使用することを検討する。
- ・小課題 3：前処理法は、HPLC-UV 法を参考に検討する。

3) 中課題 3：単一試験室での妥当性評価

中課題 1 及び 2 で開発した方法について以下の確認を行う。

- ① 片栗粉、米粉、小麦粉及びライ麦粉等を用いて分析を行い、選択性を確認する。
なお、アスパラギンを含有している試料については、アミノ酸分析計等別の測定法を用いた定量値との比較を行う。
- ② 定量限界相当濃度からその 100 倍を目安とした濃度範囲の標準溶液を調製して検量線を作成し、直線性を確認する。
- ③ 片栗粉及び米粉を用いて次の添加回収試験を実施し、真度（回収率）、精度（併行精度、室内再現精度）、測定の不確かさ、定量限界、検出限界を確認する。
 - 添加濃度：定量限界の 100 倍、50 倍及び定量限界相当の 3 濃度
 - 繰返し数：各濃度について、同日 N=2、異条件 N=5
 - 測定の不確かさの推定：各濃度の添加回収試験による室内再現精度から推定
 - 検出限界及び定量限界の確認：定量限界相当の添加回収試験による室内再現精度から推定

- ・小課題 1：HPLC-UV 法
- ・小課題 2：LC-MS(MS)法

4) 中課題 4：複数試験室での妥当性評価

中課題 1 及び 2 で開発した方法について以下の確認を行う。

8～10 試験室において、あらかじめ濃度を確認した 5 種の試料（可能な限り異なる濃度）を準備し、次の試験を実施する。

- 試料を各試験室に配付し、各濃度 N=2 で測定を行う。
- 得られた測定値から各濃度における室間再現精度及び HorRat 値を確認する。
- ・小課題 1：HPLC-UV 法
- ・小課題 2：LC-MS(MS)法

(2) 年次計画

項目	平成27年度	平成28年度	平成29年度
1. HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発	HPLC-UV法の開発 (日本食品分析センター)		
(1) 抽出法の検討	↔		
(2) 機器の測定条件の検討	↔		
(3) 前処理法の検討	↔		
2. LC-MS(MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発		LC-MS(MS)法の開発 (日本食品分析センター)	
(1) 抽出法の検討		↔	
(2) 機器の測定条件の検討		↔	
(3) 前処理法の検討		↔	
3. 単一試験室での妥当性評価		単一試験室の妥当性評価 (日本食品分析センター)	単一試験室の妥当性評価 (日本食品分析センター)
(1) HPLC-UV法		↔	↔
(2) LC-MS(MS)法			↔
4. 複数試験室での妥当性評価		複数試験室の妥当性評価 (日本食品分析センター他)	複数試験室の妥当性評価 (日本食品分析センター他)
(1) HPLC-UV法		↔	↔
(2) LC-MS(MS)法			↔
所要経費(合計)	3,000 千円	2,730 千円	2,655 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	日本食品分析センター	藤田 和弘	—
1. HPLC-UV による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発	日本食品分析センター	○ 藤田 和弘	4
(1) 抽出法の検討	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭	5
(2) 機器の測定条件の検討	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭	6
(3) 前処理法の検討	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭	5
2. LC-MS(MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発	日本食品分析センター	○ 藤田 和弘	1
(1) 抽出法の検討	日本食品分析センター	△ 近宗 雅人 (平成 28 年 4 月～)	2
(2) 機器の測定条件の検討	日本食品分析センター	△ 近宗 雅人 (平成 28 年 4 月～)	3
(3) 前処理法の検討	日本食品分析センター	△ 近宗 雅人 (平成 28 年 4 月～)	2
3. 単一試験室での妥当性評価	日本食品分析センター	○ 藤田 和弘	1
(1) HPLC-UV 法	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭	2
(2) LC-MS(MS)法	日本食品分析センター	△ 近宗 雅人 (平成 28 年 4 月～)	2
4. 複数試験室での妥当性評価	日本食品分析センター	○ 藤田 和弘	1
(1) HPLC-UV 法	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭 (平成 28 年 4 月～)	1
	日本食品分析センター 協力機関*1	△ 土屋 仁	1
		△ —	—
(2) LC-MS(MS)法	日本食品分析センター	△ 近宗 雅人 (平成 28 年 4 月～)	1
	日本食品分析センター	△ 横関 俊昭 (平成 29 年 9 月～)	1
	日本食品分析センター 協力機関*2	△ 土屋 仁	1
		△ —	—

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付した。

*1：(株)日清製粉グループ本社、日本製粉(株)、昭和産業(株)、キューピー(株)、アサヒグループホールディングス(株)、(一財)食品環境検査協会、(一財)日本穀物検定協会

*2：(株)日清製粉グループ本社、昭和産業(株)、キューピー(株)、アサヒグループホールディングス(株)、カゴメ(株)、(一財)食品環境検査協会、(一財)日本穀物検定協会

3 研究推進会議の開催状況

別紙の(1)のとおり。

4 研究成果の概要

(1) 主要な成果

ア 成果の内容（別紙の（２）参照）

(ア) HPLC・UV による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコル

HPLC・UV による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発（p 6・1 4）。

単一試験室での妥当性評価（p 2 3・2 7）。

複数試験室での妥当性評価（p 3 3・4 2）。

(イ) LC・MS(MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコル

LC・MS(MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発（p 1 5・2 3）。

単一試験室での妥当性評価（p 2 8・3 2）。

複数試験室での妥当性評価（p 4 3・5 1）。

イ 成果の活用（別紙の（２）参照）

(ア) 該当なし。

(イ) 該当なし。

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題 1（HPLC・UV による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発）の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①アスパラギンの誘導体化条件の検討（小課題 2 関連）。（平成 2 7 年度）
↓
②HPLC 測定条件の検討（小課題 2 関連）。（平成 2 7 年度）
↓
③前処理法の検討（小課題 3 関連）。（平成 2 7 年度）
↓
④遊離アスパラギンの抽出法の検討（小課題 1 関連）。（平成 2 7 年度）
成果目標：定量限界を 20 mg/kg 以下とする、HPLC・UV による遊離アスパラギンの分析法の開発を行う。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①：アスパラギンの誘導体化条件の検討】

プレラベル誘導体化法として、イソチオシアン酸フェニル誘導体化法、フルオレサミン誘導体化法及びダンシルクロライド誘導体化法の 3 法について、アスパラギン標準溶液を用いて検討した。イソチオシアン酸フェニル誘導体化法は、HPLC 注入までに複数回の乾固を要し、操作が煩雑であったため不採用とした。フルオレサミン誘導体化法は、誘導体化後の反応液を直接 HPLC に注入できる点で操作が簡便であるが、ODS カラムにおいてアスパラギンとグルタミンの分離が出来なかったため不採用とした。ダンシルクロライド誘導体化法は、ODS カラムにおいてアスパラギンとの近接が予想されるグルタミンとの分離が確認できたため、本誘導体化法を採用した。ダンシルクロライド誘導体化法は乾固を要する操作であるが、誘導体化後の検液をヘキサン分配することにより、未反応のダンシルクロライドが除去でき、下層をそのまま HPLC に注入できた。この操作により、HPLC 注入までの操作の簡便性が増した。

さらに誘導体化条件の最適化のため、以下の検討を行った。

① 炭酸ナトリウムの最適濃度の検討

ダンシルクロライドでアスパラギンを誘導体化するために必要な炭酸ナトリウムの最適濃度について検討した。50 µg/mL アスパラギンの 5 %トリクロロ酢酸水溶液 1 mL に、0.5~1 mol/L の炭酸ナトリウム 0.5 mL を加え、誘導体化の状況をピーク面積の平均 (N=2) によって評価した。その結果、図 1 に示した通り、0.75 mol/L 炭酸ナトリウムを加えることによって、ピーク強度が最大になったため、炭酸ナトリウムの濃度は 0.75 mol/L とした。

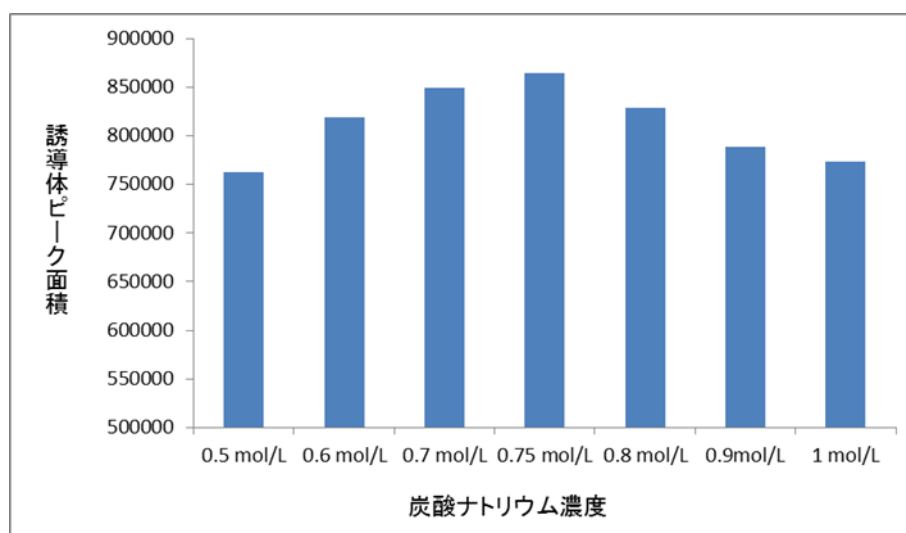


図 1 炭酸ナトリウム濃度による誘導体化条件の検討結果

② 反応温度及び時間の検討

誘導体化における最適な反応温度及び時間について検討した。反応温度は「衛生試験法・注解の腐敗アミン類の分析法」に従い、45℃とした。50 µg/mL アスパラギンの5%トリクロロ酢酸溶液1 mLに、0.75 mol/L 炭酸ナトリウム0.5 mLを加え、45℃で5、10、20、30、40、50及び60分の各反応時間について、誘導体化の状況をピーク面積の平均(N=2)によって評価した。その結果、図2に示したように、10分まではやや反応不十分な傾向が認められたが、20分～60分の間ではほぼプラトーであった。また30分で誘導体のピーク面積が頭打ちになることから、ここで反応がほぼ終了すると考えられ、誘導体化時の反応時間は30分とした。

(平成27年度及び28年度)

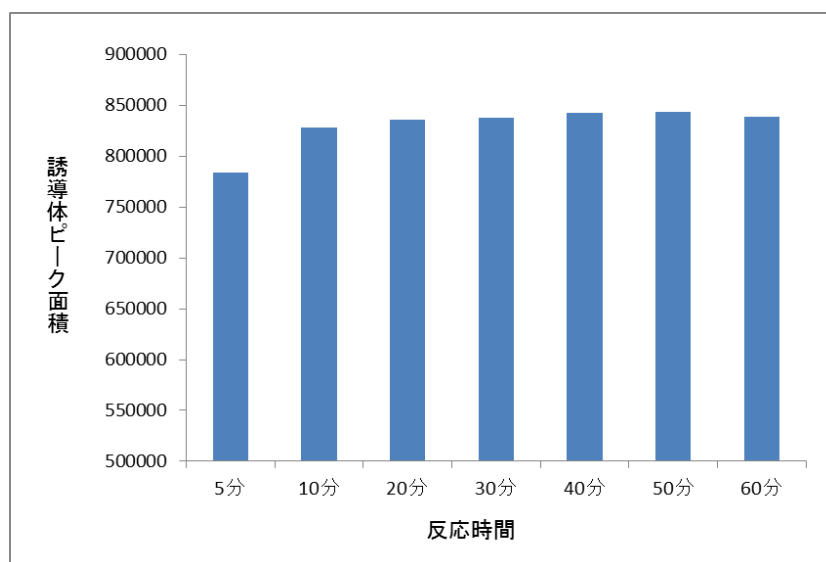


図2 反応時間による誘導体化条件の検討結果

【工程表②：HPLC 測定条件の検討】

HPLC 測定条件の最適化のため、以下の検討を行った。

① 検出器

アスパラギンのピークの直前に検出されるダンシル酸との分離向上を目的に、蛍光分光光度計（FL）が有効であるかを確認した。その結果、FL ではアスパラギンのピーク強度が UV と比較して低下する一方、ダンシル酸のピーク強度は逆に増大し、アスパラギンとの分離が悪くなった。よって、紫外可視分光光度計を使用することとした。

② 移動相及び分析カラム

移動相は LC-MS 分析にも適用することを想定して、A 液に 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液にアセトニトリルを用いて検討を行った。その結果、ダンシルクロライド法によるアミノ酸分析の文献¹⁾に記載された、A 液にリン酸緩衝液を用いた分析とほぼ同様のクロマトグラムが得られたことから、A 液には 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いることとした。

分離カラムは、15 種の穀類において、夾雑物質と最も良好な分離が得られ、アスパラギンのピーク形状が良好であった Hydrosphere C18、φ4.6 mm×150 mm、粒径 3 μm [YMC 製] を採用した。検量線は、ピーク面積を用いることにより、0.5~100 μg/mL の広範囲で良好な直線性が確認できた（図 3～9）。

なお、同サイズの Inertsil-ODS4 [GL サイエンス製] 及び Mightysil RP-18 GP [関東化学製] では、夾雑物質との十分な分離が得られなかったが、Unison UK-C18 [Imtakt 製] 及び InertSustain AQ-C18 [GL サイエンス製] は同等の性能を示したため、これらのカラムも使用可能と考えられた。（平成 27 年度及び 28 年度）

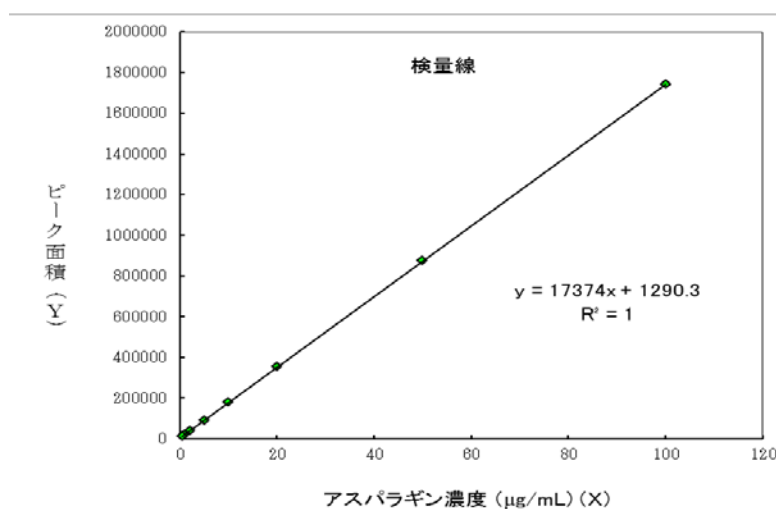


図 3 検量線例

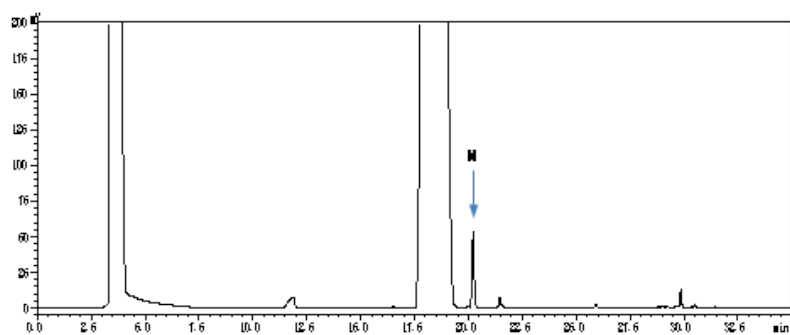


図4 アスパラギン標準溶液 (20 µg/mL) のクロマトグラム例
(N : アスパラギン)

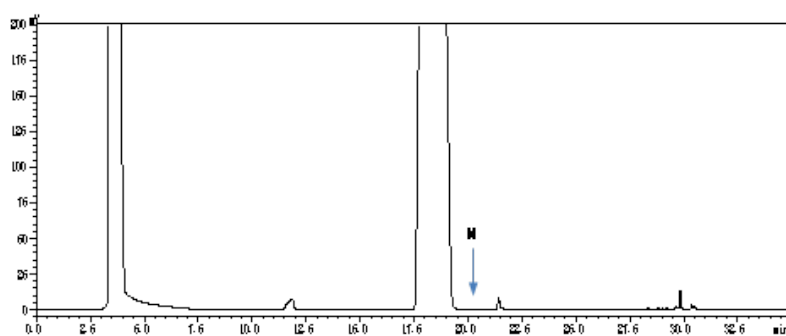


図5 片栗粉のクロマトグラム例 (N : アスパラギン)

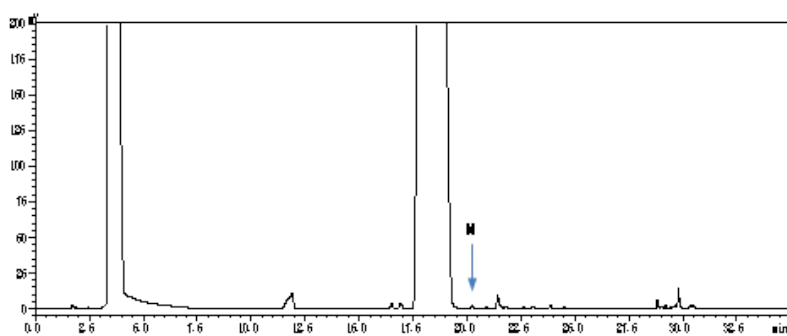


図6 米粉 (パン洋菓子用うるち米) のクロマトグラム例
(N : アスパラギン)

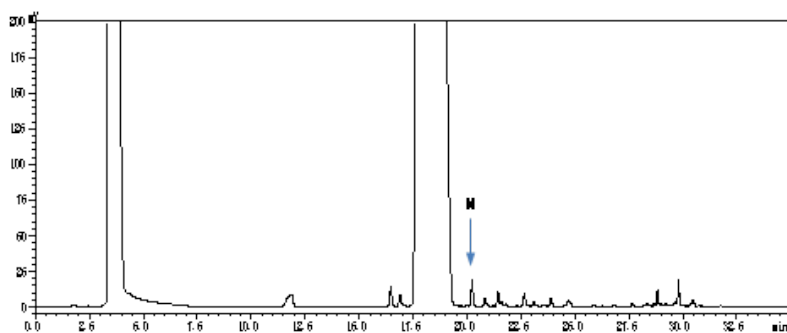


図7 ライ麦全粒粉のクロマトグラム例 (5 倍希釈液)
(N : アスパラギン)

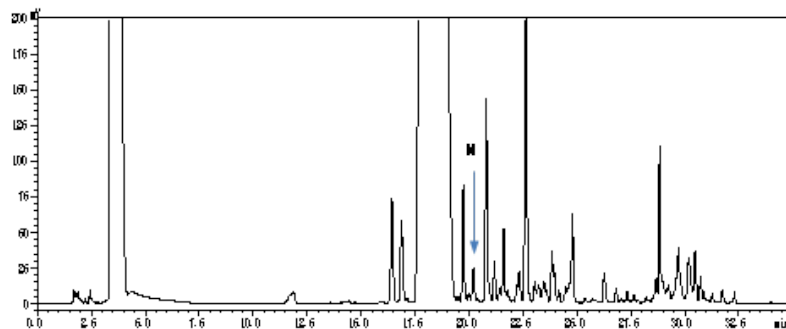


図8 大豆粉のクロマトグラム例 (N：アスパラギン)

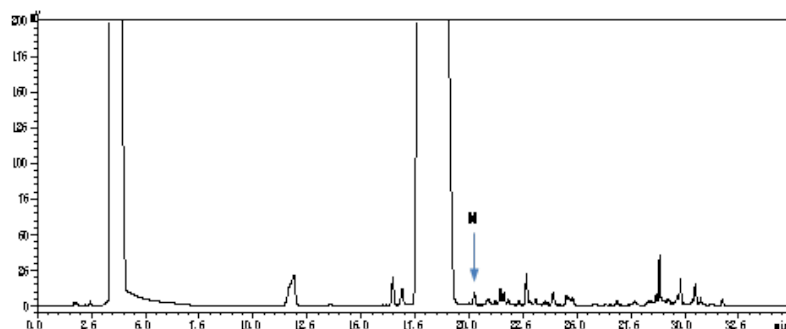


図9 大麦（押麦）のクロマトグラム例 (N：アスパラギン)

- 1) Benedito De Barber, C., Prieto, J.A., Collar, C. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Changes in Free Amino Acids During Wheat Bread Dough Fermentation. *Cereal Chemistry*, **66**, 283-288 (1989).

【工程表③：前処理法の検討】

前処理法として、以下の検討を行った。

① 陽イオン交換カラムによる精製

陽イオン交換カラムによりアスパラギンを保持させ、夾雑物質を洗浄後、アンモニアにより溶出させる精製法を検討した。まず初めに、ポリマー系陽イオン交換カラムであるOasis MCXを用いたところ、アスパラギンがMCXに保持されなかったため使用できないことが明らかとなった。次に、シリカ系陽イオン交換カラムであるBond Elut SCXを用いたところ、アスパラギンはSCXに保持されたため、SCXを用いることとした。

しかしながら、SCX による精製を穀類について行ったところ、アスパラギン周辺の夾雑ピークや抽出時の色素成分が除去できなかった。また、溶出液のアンモニア水溶液をそのまま誘導体化に用いると、トリクロロ酢酸溶液を誘導体化する場合と比較して、アスパラギンの誘導体化率が約 5 割程度まで減少した。以上の結果から、陽イオン交換カラムによる精製は不採用とした。

② ポリマー系逆相ミニカラムによる精製

陽イオン交換カラムでは十分な精製効果が得られなかったため、逆相ミニカラムによりアスパラギン以外の夾雑物質を保持させて除去する精製法を検討した。抽出液が低 pH であるため、ポリマー系の Oasis HLB を選択した。Oasis HLB (150 mg/6 cc) をメタノール、水によりコンディショニング後、5 %トリクロロ酢酸溶液でカラム内溶媒を置換した。これに抽出液 5 mL を注入し、カラム内に残存したアスパラギンを完全に溶出させるために 5%トリクロロ酢酸で洗浄した。なお、アスパラギンは HLB に吸着しないため、注入時より溶出液をメスフラスコに回収し 10 mL に定容した。

表 1 及び 2 に示したように、標準溶液では溶出に必要な 5 %トリクロロ酢酸溶液は 2 mL であることが判明した。そこで、マトリックスの影響を確認するため、片栗粉抽出液に標準溶液を添加し、再度確認したところ、表 3 及び 4 に示したように標準溶液のみと同様の結果を示した。これらの結果から余裕を見て 4 mL での溶出後、5 %トリクロロ酢酸溶液で 10 mL に定容することとした。

さらに、Oasis HLB の充填量について、30 mg、150 mg、200 mg のものを用いて夾雑成分の多い大豆粉抽出液を精製して、それらのクロマトグラムを比較することにより最適な充填量を検討した。充填量 30 mg の HLB は色素成分が完全に除去できなかったが、150 mg と 200 mg においては精製後のクロマトグラムがほぼ同等であった。よって、コスト面を考慮して 150 mg を選択した。Oasis HLB 150 mg による精製によって、穀類中から抽出される色素成分が除去され、クロマトグラムにおいても未精製の検体と比較して、夾雑成分のピーク数の減少が確認された。

(平成 27 年度及び 28 年度)

表 1 ミニカラムからの溶出率(標準溶液供試、2 mL×2回)

5 % トリクロロ酢酸溶液	負荷液	溶出液 1 回目	洗浄液 2 回目	洗浄液 3 回目
	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL
ピーク面積	702302	320504	Tr	ND

アスパラギン供試量：50 µg/mL (標準溶液中) ×5 mL、

Tr：痕跡程度、ND：検出せず

表 2 ミニカラムからの溶出率(標準溶液供試、4 mL×1回)

5 % トリクロロ酢酸溶液	負荷液	溶出液 1 回目	洗浄液 2 回目
	5 mL	4 mL	2 mL
ピーク面積	700667	162157	Tr

アスパラギン供試量：50 µg/mL (標準溶液中) ×5 mL、

Tr：痕跡程度

表3 ミニカラムからの溶出率（1000 µg添加片栗粉抽出液供試、2 mL×2回）

5 % トリクロロ酢酸溶液	負荷液	溶出液 1 回目	洗浄液 2 回目	洗浄液 3 回目
	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL
ピーク面積	144896	64589	ND	ND

アスパラギン供試量：10 µg/mL(片栗粉抽出液中)×5 mL、ND：検出せず

表4 ミニカラムからの溶出率（1000 µg添加片栗粉抽出液供試、4 mL×1回）

5 % トリクロロ酢酸溶液	負荷液	溶出液 1 回目	洗浄液 2 回目
	5 mL	4 mL	2 mL
ピーク面積	146444	32063	ND

アスパラギン供試量：10 µg/mL(片栗粉抽出液中)×5 mL、ND：検出せず

【工程表④：遊離アスパラギンの抽出法の検討】

5%トリクロロ酢酸を用いた振とう抽出法が有効であった。

なお、試料は内径 0.5 mm のメッシュを通して使用した。

開発した分析法のフローを以下に示す。

（平成27年度及び28年度）

5 %トリクロロ酢酸抽出

- | 試料採取 10 g
- | 5 %トリクロロ酢酸溶液 100 mL を加え 20 分間振とう
- | 遠心分離（1000 ×g、5 分間）
- | ろ過（ADVANTEC ガラス繊維ろ紙、GA-55、125 mm）
- | 高濃度が予想される検体においては、予め 5 %トリクロロ酢酸溶液にて 5 倍
- ↓ 希釈を行う(例：4 mL 分取して 20 mL に定容する)

ポリマー系逆相ミニカラムによる精製

- | [Oasis HLB(充てん量 150 mg)]
- | [カラムを予め、メタノール、水及び 5 %トリクロロ酢酸各 10 mL で順に洗浄]
- | 試料溶液 5 mL をポリマー系逆相ミニカラムに注入
- | 注入時より 10 mL メスフラスコに回収
- | 5 %トリクロロ酢酸溶液 4 mL を加えアスパラギンを溶出
- ↓ 5 %トリクロロ酢酸溶液で 10 mL に定容

ダンシルクロライドによる誘導体化（以下、標準溶液も同様操作する。）

- | 試料液 1 mL（0.05 g 相当）を褐色ねじ口試験管に分取
- | 0.75 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加え混和
- | 1 %ダンシルクロライド・アセトン溶液 1 mL を加え混和

- | 45℃で 30 分間反応
- | ヘキサン 2 mL を加え混和
- | 遠心分離 (1000 ×g、3 分間)
- | 下層を分取
- | ディスクろ過 (親水性 PTFE、0.45 μm)
- ↓ ただし、浮遊物の見られる検体のみ実施

HPLC-UV 定量

HPLC 操作条件

機 種 : LC-20AD [株式会社 島津製作所製]

検 出 器 : 紫外可視分光光度計 SPD-20AV [株式会社 島津製作所製]

カ ラ ム : Hydrosphere C18 [YMC 製]、Unison UK-C18 [Imtakt 製] また
は InertSustain AQ-C18 [GL サイエンス製] φ4.6 mm×150 mm、
粒径 3 μm

温 度 : 40 °C

移 動 相 : A 液 ; 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液 ; アセトニトリル

グラジエント : B 液 5%(0 分)→35%(24 分)→90%(25 分)→90%(35 分)→
5%(36 分)→5%(60 分)

流 量 : 1.0 mL/min

注 入 量 : 10 μL

測定波長 : 254 nm

(ウ) 成果目標に対する達成状況

成果目標を達成した。

イ 中課題 2 (LC-MS/MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発) の研究成果
の概要

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①LC-MS/MS測定条件 (小課題 2 関連)。(平成 2 8 年度)
↓
②前処理法の検討 (小課題 3 関連)。(平成 2 8 年度)
↓
③遊離アスパラギンの抽出法の検討 (小課題 1 関連)。(平成 2 8 年度)
成果目標：定量限界を 20 mg/kg 以下とする、LC-MS/MS)による遊離アスパラギンの分析法の開発を行う。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①：LC-MS/MS測定条件】

当初案では、HPLC-UV 法に倣って、誘導体化後に逆相系カラムを用いて測定することとしていたが、近年、HILIC 系カラムを用いて極性物質を分析する事例が報告されていることから、まずは誘導体化せずに、LC-MS を用いて測定する条件を検討することとした。

分析カラムとして、PFP (Penta Fluoro Phenyl) 系のカラムである Discovery HS F5 [シグマアルドリッチ製] を選択し、移動相条件として A 液に 0.1 %ギ酸溶液、B 液にアセトニトリルを用いて組成比の違いによるアスパラギンとグルタミン (機器メーカーのアプリケーションノートの情報からアスパラギンと最も保持時間が近接) の分離を検討した。組成比を 10 : 90、20 : 80、30 : 70、・・・、90 : 10 と変えて検討した結果、30 : 70 の組成比で最も分離度 (Rs) *が良好であったため、0.1 %ギ酸溶液：アセトニトリル=30 : 70 を採用した (図 1 0)。

また、本移動相条件で近接が予想されたアミノ酸 5 種 (アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、セリン、グリシン) について確認したところ、分離が可能であった。アミノ酸 5 種のトータルイオンクロマトグラム (TIC) 及び選択イオンモニタリング (SIM) クロマトグラム例を図 1 1 に示した。

なお、ほぼ同サイズの Pursuit 3 PFP [アジレント・テクノロジー製] 及び Luna 3µm PFP(2) 100Å [フェノメネックス製] では、アスパラギンと他のアミノ酸 4 種における分離が十分得られなかったが、サイズは異なるが、YMC-Triart PFP [ワイエムシー製、φ2.1 mm×150 mm、粒径 1.9 µm] は同等の性能を示したため、このカラムは代用可能と考えられた (図 1 2)。

$$* : R_s = 1.18 \times \{(t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})\}$$

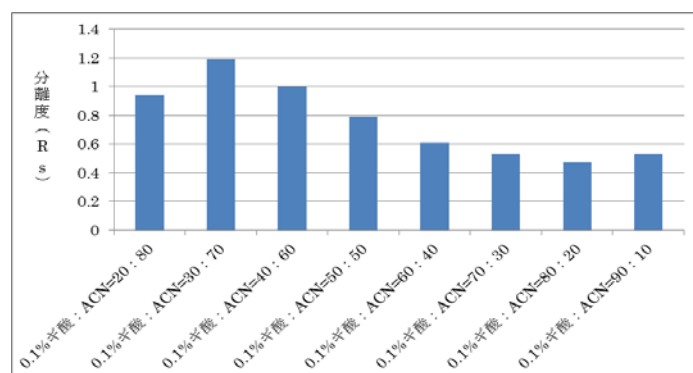


図 1 0 アスパラギンとグルタミンの分離度(Rs)における移動相組成比の影響

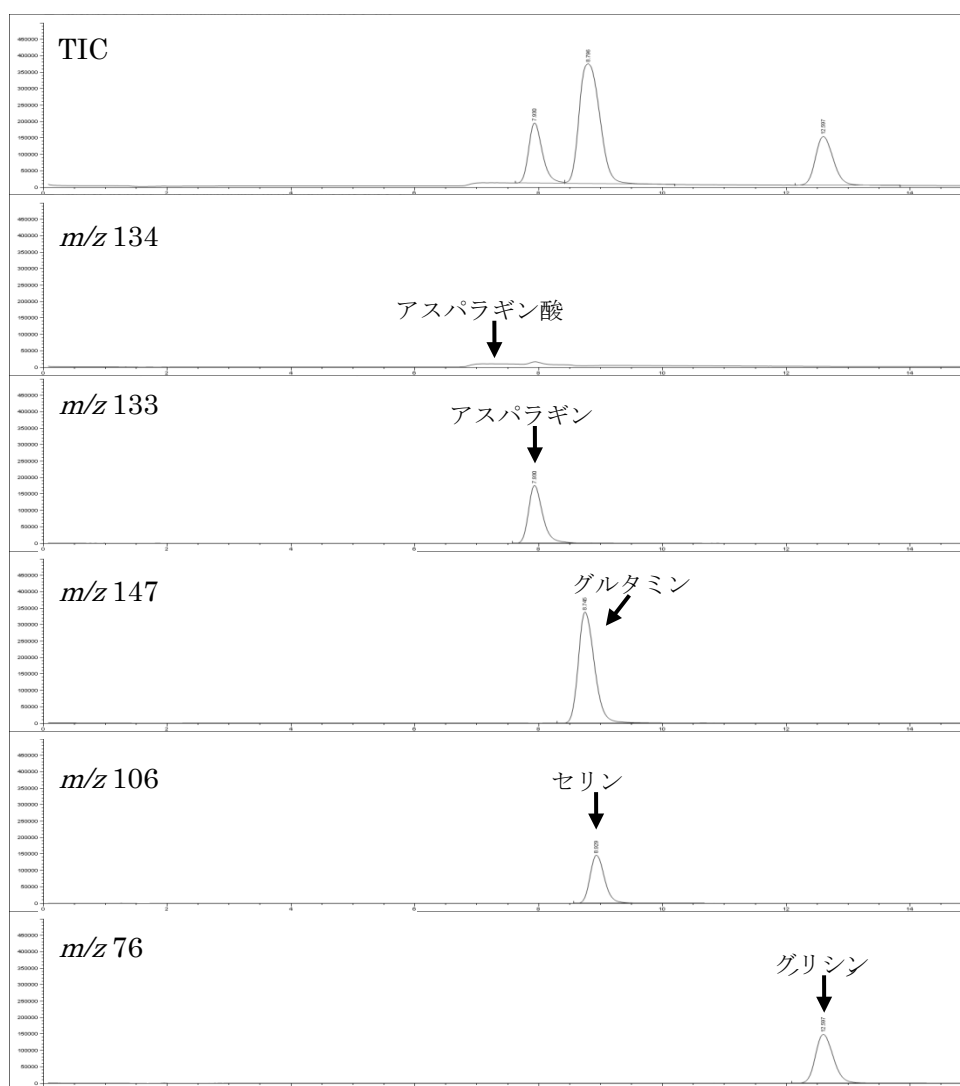


図 1 1 アミノ酸 5 種（アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、セリン、グリシン）の標準溶液（2 $\mu\text{g/mL}$ ）の TIC クロマトグラム（1 段目）及び SIM クロマトグラム（2～6 段目）例（Discovery HS F5、 $\phi 2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ 、粒径 3 μm ）

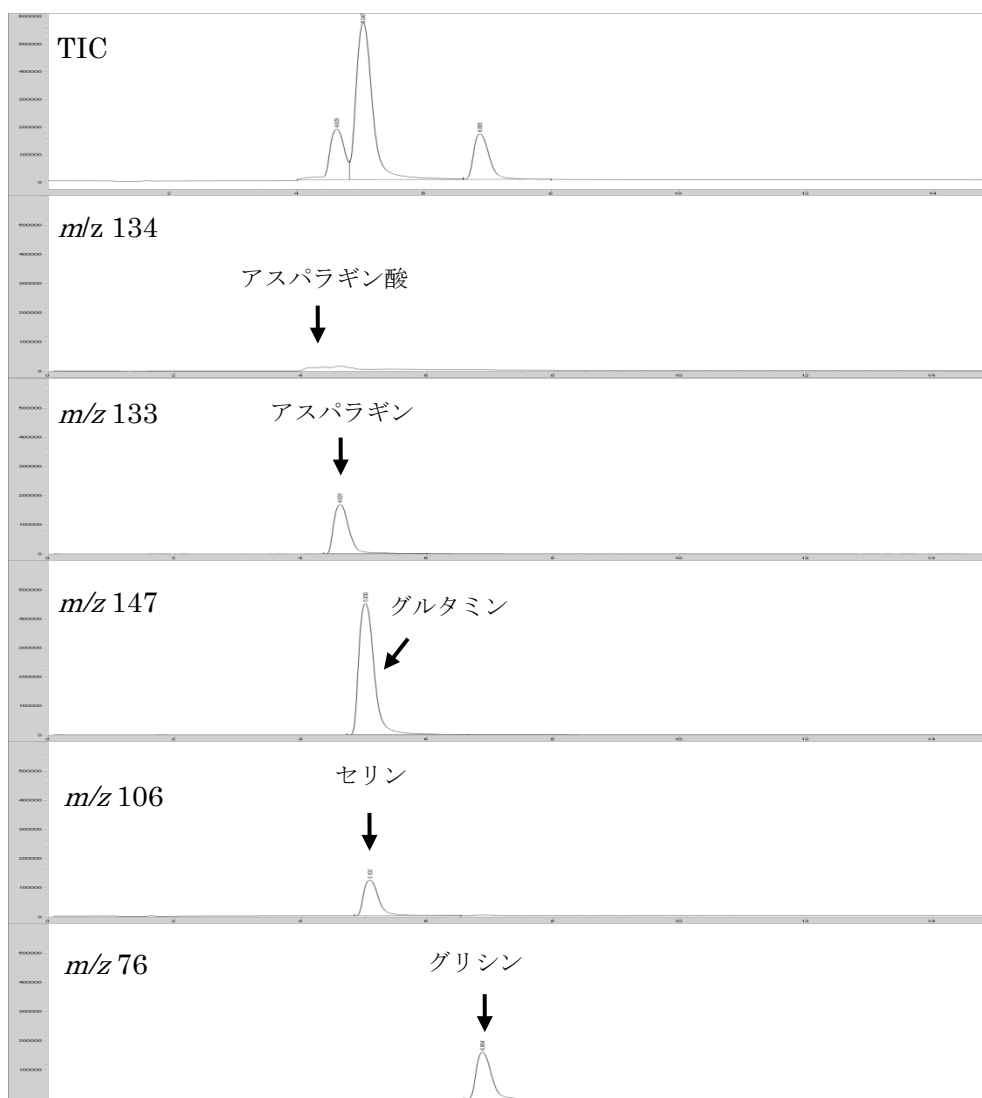


図1 2 アミノ酸5種（アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、セリン、グリシン）の標準溶液（2 $\mu\text{g/mL}$ ）のTICクロマトグラム（1段目）及びSIMクロマトグラム（2～6段目）例（YMC-Triart PFP、 $\phi 2.1\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ 、粒径 1.9 μm ）

LC-MS/MS を用いて測定する場合を想定し、測定モードの検討を行った。定量下限相当のアスパラギン標準溶液 (0.005 $\mu\text{g/mL}$) について SRM 測定及び SIM 測定について S/N 比を比較した結果、SIM 測定よりも SRM 測定の S/N 比が良好であった。(図 1 3)。よって、測定モードとして SRM 測定 (m/z 133.1>74.0 (定量用) 及び m/z 133.1>87.1 (確認用)) を採用することとした。

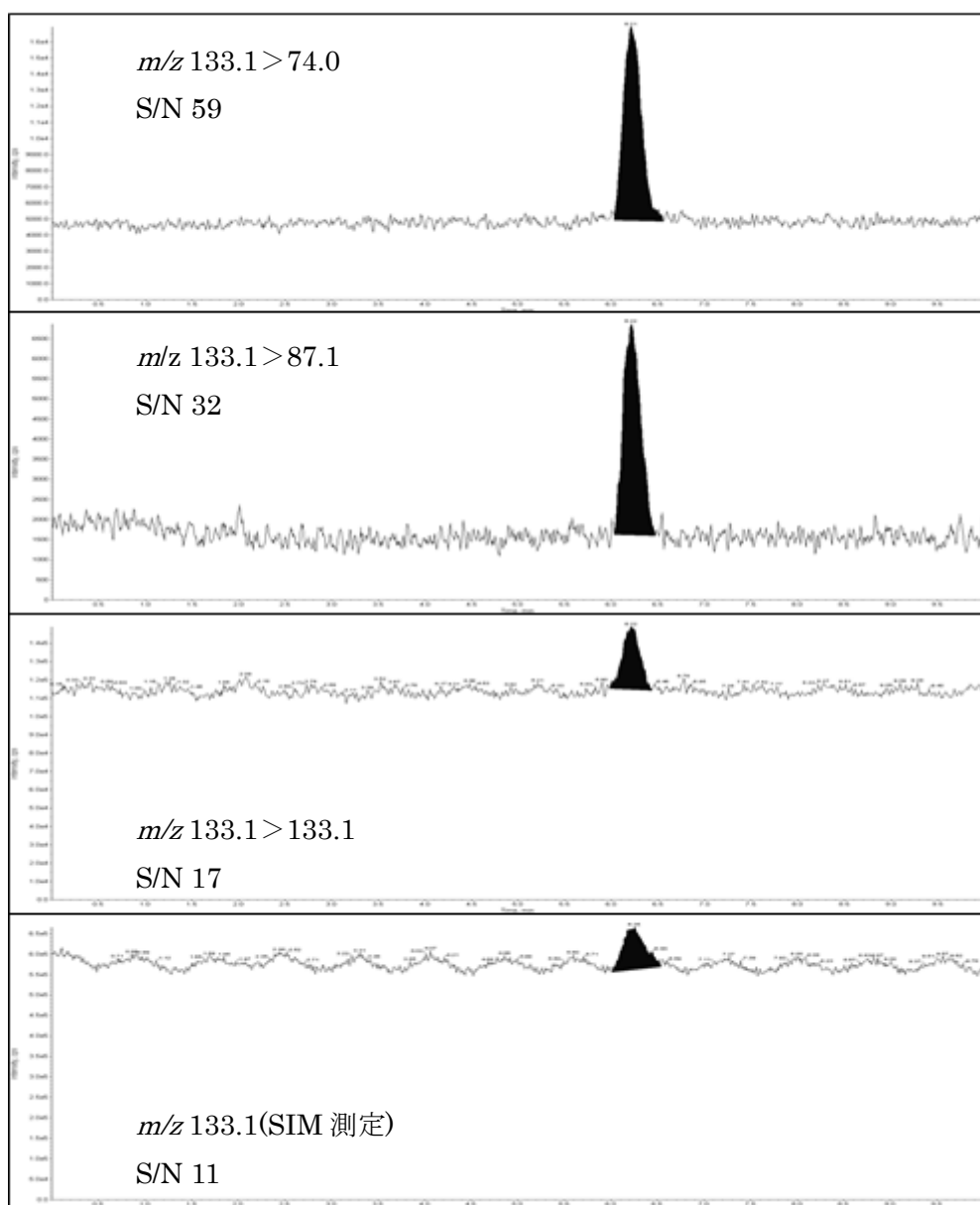


図 1 3 アスパラギン標準溶液 (0.005 $\mu\text{g/mL}$) の SRM クロマトグラム及び SIM クロマトグラム例

確立した以下の LC-MS 操作条件で、アスパラギン濃度 0.005~0.1 µg/mL の範囲での検量線の直線性を確認した。その結果、HPLC-UV よりも高感度に測定が可能であり、決定係数も 0.9999 と良好な直線性を示した (図 1 4)。

LC-MS 操作条件

機種：LC部；1260[Agilent Technologies],

MS部；6130[Agilent Technologies]

カラム：Discovery HS F5、φ2.1 mm×150 mm、粒径 3 µm

[シグマアルドリッチ製]

温度：40 °C

移動相：A 液；0.1 %ギ酸溶液、B 液；アセトニトリル

グラジエント：B 液 70%(0 分)→70%(10 分)→5%(10.1 分)→
5%(15 分)→70%(15.1 分)→70%(25 分)

流量：0.2 mL/min

注入量：2 µL

イオン化法：ESI(正イオン検出モード)

測定モード：SIM

設定質量数(m/z)：133

フラグメンター電圧：120 V

ネブライザーガス：窒素、50 psi

乾燥ガス温度：350 °C

乾燥ガス流量：10 L/min

キャピラリー電圧：3000 V

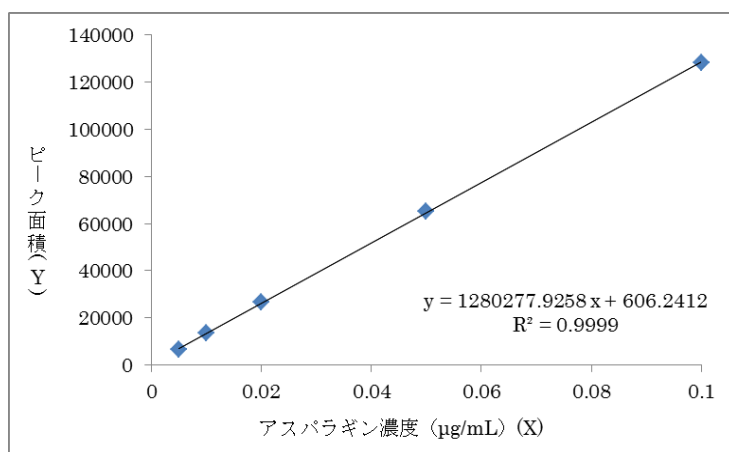


図 1 4 検量線例

また、LC-MS/MS の場合も、SRM 測定により、アスパラギン濃度 0.005~0.1 µg/mL の範囲での検量線が決定係数 0.9999 と良好な直線性を示した (図 1 5)。LC-MS/MS 操作条件を以下に示した。

(平成 2 8 年度)

LC-MS/MS 操作条件

機 種 : LC 部 ; 1100series[Agilent Technologies],

MS 部 ; API-4000 [SCIEX]

カ ラ ム : Discovery HS F5、φ2.1 mm×150 mm、粒径 3 µm

[シグマアルドリッチ製]

温 度 : 40 °C

移 動 相 : A 液 ; 0.1 %ギ酸溶液、B 液 ; アセトニトリル

グラジエント : B 液 70%(0 分)→70%(10 分)→5%(10.1 分)→

5%(15 分)→70%(15.1 分)→70%(25 分)

流 量 : 0.2 mL/min

注 入 量 : 2 µL

イオン化法 : ESI(正イオン検出モード)

測定モード : SRM

カーテングス : 50 psi、ネブライザーガス : 60 psi

乾燥ガス : 70 psi、乾燥ガス温度 : 650 °C

コリジョンガス : 窒素

イオン化電圧 : 5500 V、DP電圧 : 26 V

設定質量数(m/z), コリジョンエネルギー(CE ; eV) :

133.1>74.0 (20) (定量用), 133.1>87.1 (20) (確認用)

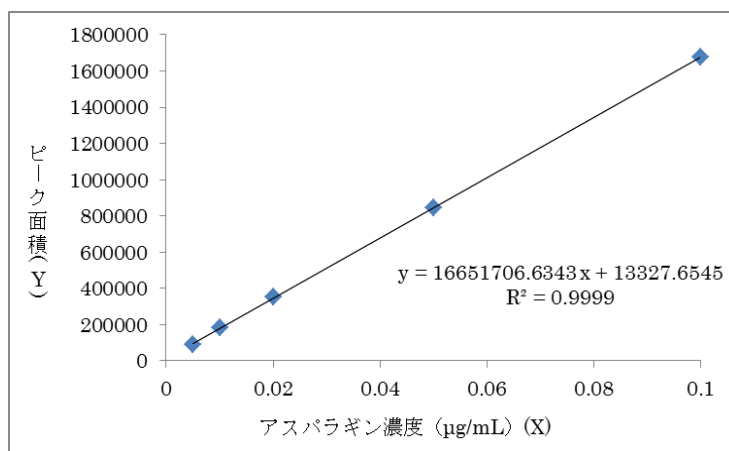


図 1 5 検量線例 (LC-MS/MS : m/z 133.1>74.0)

【工程表の②：前処理法の検討】

HPLC-UV 法よりも高感度・高選択性であったため、5 %トリクロロ酢酸抽出後、0.1 %ギ酸溶液による希釈のみで測定が可能であった。

(平成28年度)

【工程表の③：遊離アスパラギンの抽出法の検討】

HPLC-UV 法の抽出法を適用した。試料は0.5 mmのメッシュを通して使用した。

なお、HPLC-UV 法の複数試験室での妥当性確認の際に、参画機関から、試料採取量は2 g程度がよいとの意見があったため、2 gで対応可能か検討した。

小麦全粒粉を用いて、2 g採取（抽出液量20 mL）と10 g採取（抽出液量100 mL）について試行5回で実施し、得られた測定値を分散分析により評価した。その結果、P値が0.1より大きく、また、観測された分散比がF境界値よりも小さかったことから測定結果は同等と判断され、試料採取量として2 gを選択しても問題ないものと考えられた（表5）。

表5 分散分析結果

グループ	標本数	合計	平均	分散
2 g	5	2706	541.2	6160.7
10 g	5	2578	515.6	1897.3

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F境界値
グループ間	1638.4	1	1638.4	0.406651775	0.541491	5.317655
グループ内	32232	8	4029			
合計	33870.4	9				

開発した分析法のフローを以下に示す。

(平成28年度)

5 %トリクロロ酢酸抽出

- | 試料採取 2 g
- | 5 %トリクロロ酢酸溶液 20 mLを加え20分間振とう
- | 遠心分離（1000 ×g、5分間）
- | ろ過（ADVANTEC ガラス繊維ろ紙、GA-55、125 mm）
- | 0.1 %(v/v)ギ酸溶液にて100倍希釈を行う（例：1 mL分取して100 mLに定容）
- | （高濃度が予想される検体は、さらに0.1 %(v/v)ギ酸溶液にて希釈する）
- ↓ ディスクろ過（親水性PTFE、0.2 μm）

LC-MS(MS)定量

LC-MS 操作条件

機 種 : LC部 ; 1260[Agilent Technologies],
MS 部 ; 6130[Agilent Technologies]
カ ラ ム : Discovery HS F5、 ϕ 2.1 mm $\times$ 150 mm、粒径 3 μ m
[シグマアルドリッチ製]
温 度 : 40 $^{\circ}$ C
移 動 相 : A 液 ; 0.1 %(v/v)ギ酸溶液、B 液 ; アセトニトリル
グラジエント : B 液 70%(0 分) $\rightarrow$ 70%(10 分) $\rightarrow$ 5%(10.1 分) $\rightarrow$
5%(15 分) $\rightarrow$ 70%(15.1 分) $\rightarrow$ 70%(25 分)
流 量 : 0.2 mL/min
注 入 量 : 2 μ L
イオン化法 : ESI(正イオン検出モード)
測定モード : SIM
設定質量数(m/z) : 133
フラグメンター電圧 : 120 V
ネブライザーガス : 窒素、50 psi
乾燥ガス温度 : 350 $^{\circ}$ C
乾燥ガス流量 : 10 L/min
キャピラリー電圧 : 3000 V

LC-MS/MS 操作条件

機 種 : LC部 ; 1100series[Agilent Technologies],
MS 部 ; API-4000 [SCIEX]
カ ラ ム : Discovery HS F5、 ϕ 2.1 mm $\times$ 150 mm、粒径 3 μ m
[シグマアルドリッチ製]
温 度 : 40 $^{\circ}$ C
移 動 相 : A 液 ; 0.1 %(v/v)ギ酸溶液、B 液 ; アセトニトリル
グラジエント : B 液 70%(0 分) $\rightarrow$ 70%(10 分) $\rightarrow$ 5%(10.1 分) $\rightarrow$
5%(15 分) $\rightarrow$ 70%(15.1 分) $\rightarrow$ 70%(25 分)
流 量 : 0.2 mL/min
注 入 量 : 2 μ L
イオン化法 : ESI(正イオン検出モード)
測定モード : SRM
カーテングス : 50 psi、ネブライザーガス : 60 psi
乾燥ガス : 70 psi、乾燥ガス温度 : 650 $^{\circ}$ C
コリジョンガス : 窒素

イオン化電圧：5500 V、DP電圧：26 V

設定質量数(m/z)， コリジョンエネルギー(CE； eV)：

133.1>74.0 (20) (定量用)， 133.1>87.1 (20) (確認用)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

成果目標を達成した。

ウ 中課題3 (単一試験室での妥当性評価) の研究成果の概要

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①HPLC・UV 法の妥当性評価 (小課題1 関連)。(平成28年度) ↓ ②LC-MS(MS)法の妥当性評価 (小課題2 関連)。(平成28年度及び29年度)
成果目標：コーデックス委員会が定める性能基準を満たすこと。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①：HPLC・UV 法の妥当性評価】

HPLC・UV 法について、以下の内容の妥当性評価を実施し、成果目標を満たすことを確認した。以下に詳細を示す。

① 検量線の直線性

アスパラギン濃度 0.5～100 µg/mL 範囲で決定係数 1 の良好な直線性を得た (図16)。

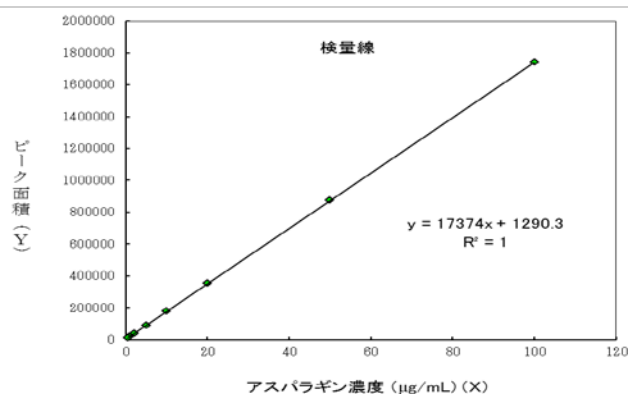


図16 検量線例

② 選択性の確認

15種の試料について分析を行い、アミノ酸分析計（AA）と数値を比較することにより選択性を確認した。

測定結果を表6に示した。また、片栗粉を除く14種の試料の両方法の測定結果について、HPLC-UV法の測定値を目的変数y、アミノ酸分析計の測定値を説明変数xとする回帰分析により評価したところ、表7に示したように傾きの95 %信頼区間は1を含み、y切片の95 %信頼区間は0を含んだことから、両方法の測定結果は同等と判断し、選択性に問題ないものと考えた。

表6 選択性の確認

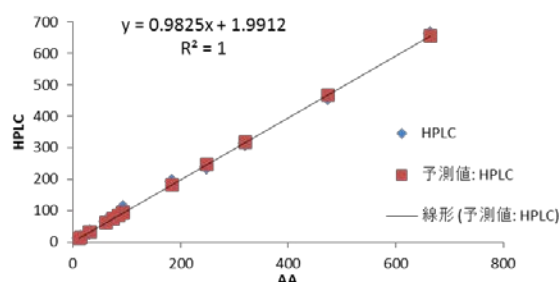
識別 番号	商品名	結果 (mg/kg)	
		AA	HPLC-UV
1	片栗粉	< 10	< 20
2	はったい粉	12	< 20 (12)
3	そば粉	94	111
4	うるち米粉	14	< 20 (15)
5	うるち玄米粉	31	31
6	小麦全粒粉	321	313
7	小麦 薄力粉	92	90
8	小麦 中力粉	32	32
9	小麦 強力粉	85	82
10	ライ麦全粒粉	665	664
11	大豆粉	185	193
12	コーンフラワー	75	74
13	オートミール	475	459
14	押麦（大麦）	61	64
15	普通精麦（もち性大麦）	249	237

N=2 で実施。

回帰分析に供するため、整数位まで算出した（括弧内は参考値）。

表 7 回帰分析結果

回帰統計	
重相関 R	0.999293133
重決定 R ²	0.998586766
補正 R ²	0.998468997
標準誤差	7.506484596
観測数	14



分散分析表

	自由度	変動	分散	観測された分散比	有意 F
回帰	1	477778.1894	477778.1894	8479.16575	1.79829E-18
残差	12	676.1677318	56.34731099		
合計	13	478454.3571			

	係数	標準誤差	t	P-値	下限 95%	上限 95%
切片	1.991208025	2.710221256	0.734703125	0.476633101	-3.913856818	7.896272868
AA (傾き)	0.982485608	0.010669637	92.08238566	1.79829E-18	0.959238466	1.005732749

③ 真度（回収率）、精度（併行精度、室内再現精度）、測定の不確かさ、定量下限、検出限界

以下の試験設計のもとに添加回収試験を行い評価した。

- ・ 試料
片栗粉、うるち米粉、小麦全粒粉
- ・ 添加濃度
片栗粉及びうるち米粉は、20、500及び1000 mg/kg相当量、小麦全粒粉は、500及び1000 mg/kg相当量とした。
うるち米粉及び小麦全粒粉については無添加区との差引で評価した。
また、試験では、試料採取後に各添加濃度に応じた標準溶液を添加し、20分間放置した後に抽出液を加えた。
- ・ 繰り返し数
各濃度について、同日N=2の分析を、日を変えて5日間実施した。
- ・ 測定の不確かさの推定
各濃度の室内再現精度の標準偏差から推定。包含係数（k）は2とした。
- ・ 検出限界（LOD）及び定量限界（LOQ）の確認
片栗粉及びうるち米粉における20 mg/kg相当量の添加回収試験による室内再現精度の標準偏差（SD）を用い、以下の式により算出した。

$$\text{LOD} = 2 \times 1.833 * \times \text{SD}, * : t \text{ 値}(95\% \text{ 片側})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$$

各試料の測定結果を表8～10に、室内再現精度に関するHorRat_i値の算出結果を表11に示した。

また、参考までにアミノ酸分析計での回収率（N=2）を表12に示した。

表 8 片栗粉による添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
20	102.6 (93.3~110.9)	1.4	6.2	1.27	2.54	5	13
500	99.7 (96.9~103.4)	2.0	2.3	11.3	22.6	—	—
1000	98.2 (95.9~99.9)	0.8	1.4	14.0	28.1	—	—

表 9 うるち米粉による添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
20	98.6 (96.9~101.2)	1.7	1.7	0.33	0.65	2	4
500	99.3 (96.5~101.0)	1.1	1.5	7.35	14.7	—	—
1000	98.1 (94.5~99.7)	1.7	1.7	17.0	33.9	—	—

表 10 小麦全粒粉による添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ
500	97.7 (91.8~101.2)	1.1	3.2	15.8	31.7
1000	98.5 (96.2~100.0)	1.0	1.5	14.4	28.8

表 1 1 HorRat _r 値の算出		
試料	添加濃度 (mg/kg)	HorRat _r 値*
片栗粉	20	1.2
	500	0.7
	1000	0.5
うるち 米粉	20	0.3
	500	0.5
	1000	0.6
小麦 全粒粉	500	1.0
	1000	0.5

*：実測値(RSD_{rw})/予測値(PRSD_{rw})、
 なお、予測値は“PRSD_{rw} = C^{-0.1505}”と
 して算出した。

表 1 2 アミノ酸分析計での回収率		
試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率(%)
片栗粉	10	108.6
	500	103.0
	1000	103.4
うるち 米粉	10	104.2
	500	105.2
	1000	105.2
小麦 全粒粉	500	102.9
	1000	103.8

真度(回収率)は、いずれもコーデックス委員会が定める性能基準の範囲(10 mg/kg ≤ C < 100 mg/kg ; 80~110%、100 mg/kg ≤ C < 1000 mg/kg ; 90~107%、1000 mg/kg ≤ C < 1 g/100 g ; 95~105%)を満たした。また、アミノ酸分析計での回収率は、やや高めの回収率であったが、こちらも手続きマニュアルの範囲内であった。

室内再現精度をHorRat_r値で評価したところ、いずれも同基準(2以下)を満たした。

なお、Codex委員会が定める性能基準では、HorRat_r値を室間再現精度の指標として規定しているため、HorRat_r値の計算に当っては、Horwitz式を用いて添加濃度から推定される室間再現精度を2で除した数値を、予測値(PRSD_{rw})として用いた²⁾。

LOQ は、20 mg/kg 未満であり、本事業の要求事項を満たした。

(平成28年度)

- 2) AOAC International. "Appendix K: Guideline for Dietary Supplements and Botanicals, Part I ; AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals". Official Method of Analysis of AOAC, 20th ed. 2016.

【工程表の②：LC-MS(MS)法の妥当性評価】

LC-MS 法について、以下の内容の妥当性評価を実施し、成果目標を満たすことを確認した。以下に詳細を示す。

① 検量線の直線性

アスパラギン濃度 0.005～0.1 µg/mL 範囲で決定係数 0.9999 と良好な直線性を得た（図 1 7）。

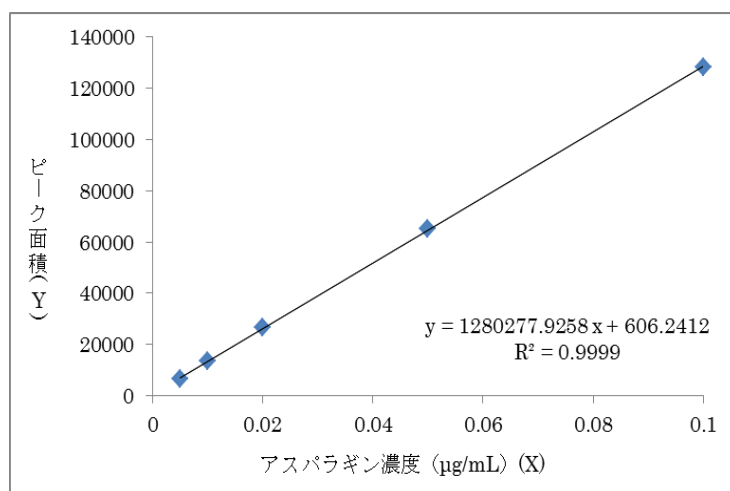


図 1 7 検量線例

② 選択性の確認

15種の試料について分析を行い、HPLC-UV法と数値を比較することにより選択性を確認した。

測定結果を表 1 3 に示した。また、片栗粉を除く14種の試料の両方法の測定結果について、LC-MS法の測定値を目的変数y、HPLC-UV法の測定値を説明変数xとする回帰分析を用いて評価したところ、表 1 4 に示したように傾きの95 %信頼区間は1をわずかに含まなかったものの、y切片の95 %信頼区間は0を含んだことから、両方法の測定結果はほぼ同等と判断し、選択性に問題ないものと考えた。

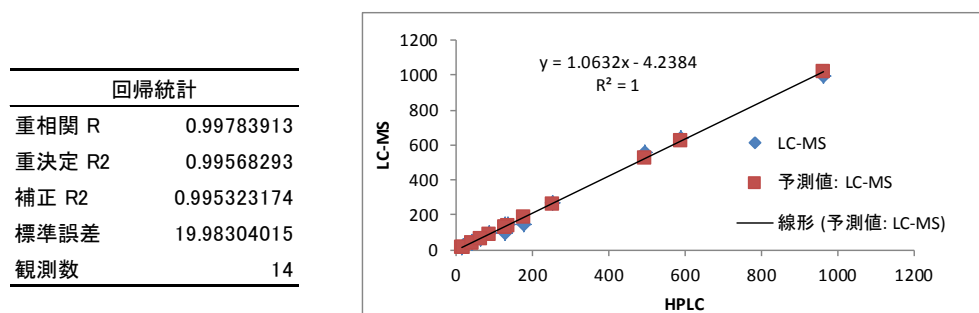
表 1 3 選択性の確認

識別 番号	商品名	結果 (mg/kg)	
		HPLC-UV	LC-MS
1	片栗粉	< 20	< 10
2	はったい粉	< 20 (15)	11
3	そば粉	127	100
4	うるち米粉	< 20 (19)	19
5	うるち玄米粉	43	45
6	小麦全粒粉	496	558
7	小麦 薄力粉	87	93
8	小麦 中力粉	42	37
9	小麦 強力粉	137	146
10	ライ麦全粒粉	962	994
11	大豆粉	252	273
12	コーンフラワー	129	147
13	オートミール	590	642
14	押麦 (大麦)	63	65
15	普通精麦 (もち性大麦)	178	148

N=2 で実施。

回帰分析に供するため、整数位まで算出した（括弧内は参考値）。

表 1 4 回帰分析結果



分散分析表

	自由度	変動	分散	観測された分散比	有意 F
回帰	1	1105188.494	1105188.494	2767.66316	1.46302E-15
残差	12	4791.862726	399.3218938		
合計	13	1109980.357			

	係数	標準誤差	t	P-値	下限 95%	上限 95%
切片	-4.238353636	7.004803893	-0.605063853	0.556406015	-19.50051023	11.02380296
HPLC(傾き)	1.063164634	0.020208957	52.60858447	1.46302E-15	1.019133099	1.107196169

③ 真度（回収率）、精度（併行精度、室内再現精度）、測定の不確かさ、定量下限、検出限界

以下の試験設計のもとに添加回収試験を行い評価した。なお、装置はLC・MSとLC-MS/MSの両方で実施した。

- ・ 試料
片栗粉、うるち米粉、小麦全粒粉
- ・ 添加濃度
片栗粉及びうるち米粉は、10、500及び1000 mg/kg相当量、小麦全粒粉は、500及び1000 mg/kg相当量とした。
うるち米粉及び小麦全粒粉については無添加区との差引で評価した。
試験では、試料採取後に各添加濃度に応じた標準溶液を添加し、20分間放置した後に抽出液を加えた。
- ・ 繰り返し数
各濃度について、同日N=2の分析を、日を変えて5日間実施した。
- ・ 測定の不確かさの推定
各濃度の室内再現精度の標準偏差から推定。包含係数（k）は2とした。
- ・ 検出限界（LOD）及び定量限界（LOQ）の確認
片栗粉及びうるち米粉における10 mg/kg相当量の添加回収試験による室内再現精度の標準偏差（SD）を用い、以下の式により算出した。

$$\text{LOD} = 2 \times 1.833 * \times \text{SD}, * : t \text{ 値}(95\% \text{片側})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$$

各試料の測定結果を表15～20に、室内再現精度に関するHorRat_r値の算出結果を表21に示した。

表15 片栗粉による試験結果（LC・MS）

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
10	95.4 (83.8~103.3)	4.3	7.1	0.68	1.36	3	7
500	98.3 (92.1~104.1)	1.6	3.7	18.1	36.3	—	—
1000	99.3 (92.8~106.4)	1.8	4.5	44.8	89.6	—	—

表 1 6 片栗粉による試験結果 (LC-MS/MS)

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
10	96.1 (82.9~102.0)	5.6	6.0	0.58	1.15	3	6
500	98.6 (93.3~102.7)	1.3	3.3	16.1	32.3	—	—
1000	99.5 (92.5~107.1)	1.2	5.5	54.3	108.6	—	—

表 1 7 うるち米粉による試験結果 (LC-MS)

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
10	98.2 (87.8~105.3)	4.3	4.7	0.46	0.92	2	5
500	99.3 (95.6~109.0)	1.4	4.7	23.5	47.0	—	—
1000	98.7 (94.4~104.2)	1.7	3.0	29.7	59.4	—	—

表 1 8 うるち米粉による試験結果 (LC-MS/MS)

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
10	100.9 (95.1~114.8)	6.0	6.0	0.61	1.21	3	6
500	97.7 (92.3~104.9)	1.9	3.8	18.6	37.1	—	—
1000	97.1 (94.9~103.6)	1.8	3.0	28.7	57.5	—	—

表 1 9 小麦全粒粉による試験結果 (LC-MS)

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ
500	98.9 (94.3~104.9)	2.8	2.8	14.0	28.0
1000	99.6 (94.2~104.9)	0.9	3.5	34.7	69.5

表 2 0 小麦全粒粉による試験結果 (LC-MS/MS)

添加濃度 (mg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内再現精度 (RSD _{rw}) (%)	標準 不確かさ	拡張 不確かさ
500	98.2 (86.5~104.6)	3.3	5.8	28.3	56.6
1000	100.3 (95.3~106.9)	2.0	3.9	38.9	77.8

表 2 1 HorRat_r値の算出

試料	添加濃度 (mg/kg)	HorRat _r 値*	
		LC-MS	LC-MS/MS
片栗粉	10	1.2	1.1
	500	1.2	1.0
	1000	1.6	1.9
うるち 米粉	10	0.8	1.1
	500	1.5	1.2
	1000	1.1	1.0
小麦 全粒粉	500	0.9	1.8
	1000	1.2	1.4

* : 実測値(RSD_{rw})/予測値(P_rSD_{rw})、なお、予測値は “ $P_{rw} = C^{0.1505}$ ” として算出した。

真度 (回収率) は、いずれもコーデックス委員会が定める性能基準 (10 mg/kg ≤ C < 100 mg/kg ; 80~110%、100 mg/kg ≤ C < 1000 mg/kg ; 90~107%、1000 mg/kg ≤ C < 1 g/100 g ; 95~105%) を満たした。

室内再現精度をHorRat_r値で評価したところ、いずれも同基準 (2以下) であった。

なお、Codex 委員会が定める性能基準では、HorRat_r 値を室間再現精度の指標として規定しているため、HorRat_r 値の計算に当っては、Horwitz 式を用いて添加濃度から推定される室間再現精度を 2 で除した数値を、予測値(P_rSD_{rw})として用いた²⁾。

LOQ は、20 mg/kg 未満であり、本事業の要求事項を満たした。

(平成 29 年度)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

成果目標を達成した。

エ 中課題 4（複数試験室での妥当性評価）の研究成果の概要

（ア）工程管理及び成果目標

工程表
①HPLC・UV 法の妥当性評価（小課題 1 関連）。（平成 28 年度） ↓
②LC-MS(MS)法の妥当性評価（小課題 2 関連）。（平成 29 年度）
成果目標：コーデックス委員会が定める性能基準を満たすこと。

（イ）各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①：HPLC・UV 法の妥当性評価】

HPLC・UV 法について、複数試験室での妥当性評価を実施し、成果目標を満たすことを確認した。以下に詳細を示す。

あらかじめ濃度を確認した 5 種の試料（うるち玄米粉、コーンフラワー、小麦強力粉、小麦全粒粉、ライ麦粉）を準備し、日清製粉グループ本社、日本製粉、昭和産業、キューピー、アサヒグループホールディングス、食品環境検査協会、日本穀物検定協会、日本食品分析センター彩都研究所、同多摩研究所の計 9 試験室で次の手順により実施した。

- ・ 各試料の均質性確認は、それぞれ試料数 10、併行測定回数 2 回で実施し、技能試験の国際ハーモナイズドプロトコルの³⁾に記載の Recommendation 8 の手順により判定して「十分に均質」であることを確認した。
- ・ 各試料 N=2 分を 15 g ずつ採取したもの（計 10 試料）を、試料の種類を伏せて各試験室に配付して測定を行った。
- ・ 得られた測定値について図 18 のフローに従って外れ値の検定を行った後、一元配置の分散分析を行い、室間再現精度及び HorRat_R 値を算出した。

なお、試験に先立ち、弊財団東京本部で説明会を実施し、その際に各試験室から出された意見に基づき、単一試験室で実施した方法から以下の点について許容することとした。

- 抽出操作は、「振とう」または「攪拌」とする。
- 抽出後の上澄み液のろ過は、「遠心分離後」または「30 分間静置後」とする。
- HPLC のオートサンプラーのクーラー温度は、「4℃」、「10℃」または「室温（成行き）」とする（10℃の安定性は後日確認した）。

各試験室の実施状況を表 2 2 に示した。

- 3) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. Pure & Appl. Chem., 78(1), 145-196 (2006).

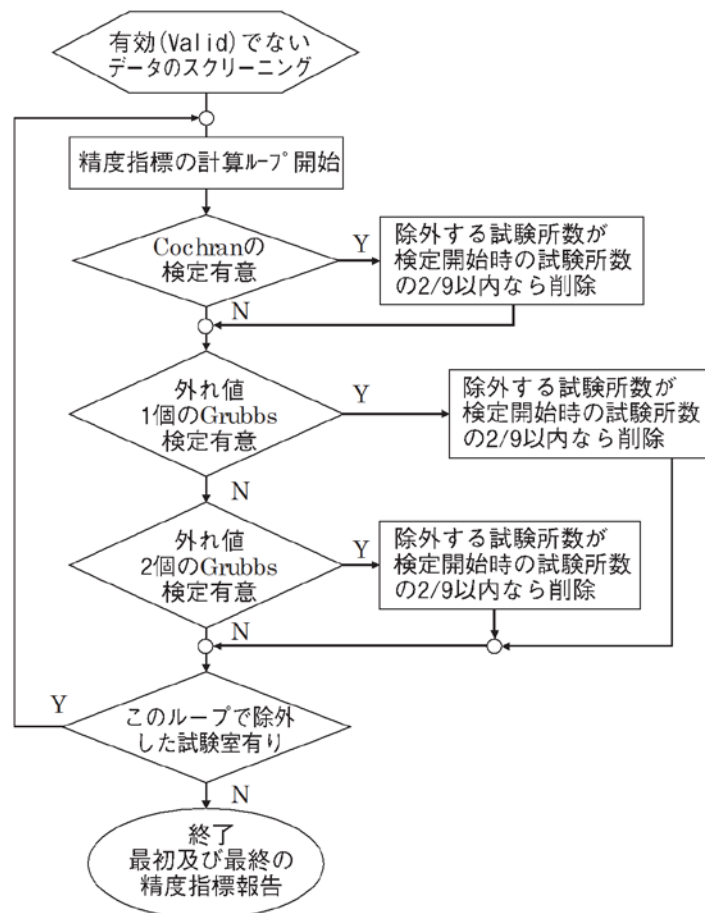


図 1 8 外れ値検定のフロー

表 2 2 各試験室の試験操作と測定条件の違い (HPLC-UV)

試験室		1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出操作		振とう	攪拌	攪拌	攪拌	振とう	振とう	振とう	攪拌	振とう
上澄み液の処理		静置	静置	静置	静置	遠心 分離	遠心 分離	遠心 分離	遠心 分離	静置
測定 条件	HPLC	Agilent 1100 series	Shimadzu Prominence	Shimadzu LC-10 series	Waters ACQUITY UPLC	Shimadzu Prominence	Agilent 1200 series	Shimadzu Prominence	Shimadzu Prominence	Shimadzu Prominence
	分析カラム	InertSustain AQ-C18	Hydrosphere C18	InertSustain AQ-C18	InertSustain AQ-C18	InertSustain AQ-C18	InertSustain AQ-C18	Unison UK-C18	InertSustain AQ-C18	InertSustain AQ-C18
	オートサンプラー のクーラー温度	室温	4℃	室温	10℃	10℃	4℃	4℃	10℃	室温

複数試験室での妥当性評価結果は、表 2 3～2 7 の通りとなった。Cochran 検定の結果、棄却されたのは小麦強力粉における 1 試験室データのみであり、評価に必要な有効試験室数 8 が確保でき、HorRatR はいずれの試料においても 2 以下の良好な結果であった。

因みに、AOAC のシングルラボラトリガイドライン²⁾の HorRatR の許容範囲は 0.5～2.0 であり、今回の妥当性評価において 0.5 を下回っている試料が 2 点あった。HorRatR が低い数値を示した場合は、分析法が簡便であったり、測定条件を揃えたりした結果であると考察される。今回の妥当性評価においてもこれらの要因が影響しているものと考えられた。

なお、方法の変更を許容した「抽出操作（振とうと攪拌）」、「上澄み液の処理（遠心分離と静置）」、「オートサンプラーのクーラー温度（4℃及び 10℃と室温）」に関して、外れ値を除いたデータについて、それぞれの相違点毎に平均値の差の検定を行った。平均値の差の検定は、等分散の検定（F 検定）の結果、等分散の場合は t-検定を、等分散でない場合は、ウェルチの検定を用いた。

その結果、表 2 8～3 0 に示すようにうるち玄米粉とコーンフラワーの「抽出操作」において有意差が見られ、振とう抽出のほうがやや高めの値となった。また、小麦強力粉の「オートサンプラーのクーラー温度」において有意差が見られ、室温のほうが低めの値となった。全体の結果としては上述通りであること、「抽出操作」では他の 3 試料では有意差が認められなかったこと、「オートサンプラーのクーラー温度」では他の 4 試料では有意差が認められなかったことから、大きな問題とは考えられないが、本結果からは振とう抽出の方が好ましいことが推測された。「オートサンプラーのクーラー温度」に関しては、標本数に偏りがあることから考察が困難であるが、室温で実施する場合はあらかじめ安定性を確認したほうが良いと思われる。

（平成 2 8 年度）

表 2 3 複数試験室での妥当性評価結果 (HPLC・UV：うるち玄米粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	36.1	36.5	36.30	0.08
2	34.1	34.0	34.05	0.005
3	30.0	31.0	30.50	0.5
4	31.3	30.8	31.05	0.125
5	33.7	34.2	33.95	0.125
6	34.0	33.3	33.65	0.245
7	35.6	34.9	35.25	0.245
8	35.5	34.8	35.15	0.245
9	36.2	33.6	34.90	3.38

解析結果

参加試験室数	9
データ解析に有効な試験室数	9
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	33.9
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	0.7
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	2.1
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.2
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	2.0
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	5.6
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	5.9
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	9.4
HorRatR	0.6

表 2 4 複数試験室での妥当性評価結果 (HPLC-UV : コーンフラワー)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	102.8	103.8	103.30	0.5
2	100.7	100.6	100.65	0.005
3	99.0	99.3	99.15	0.045
4	96.6	96.5	96.55	0.005
5	105.7	105.5	105.60	0.02
6	102.8	100.9	101.85	1.805
7	105.5	102.5	104.00	4.5
8	101.8	99.5	100.65	2.645
9	106.9	102.2	104.55	11.045

解析結果

参加試験室数	9
データ解析に有効な試験室数	9
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	101.8
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	1.5
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	4.2
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	1.5
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	3.1
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	8.6
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	3.0
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	8.0
HorRatR	0.4

表 2 5 複数試験室での妥当性評価結果 (HPLC-UV : 小麦強力粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	130.9	130.4	130.65	0.125
2	140.4	139.3	139.85	0.605
3	120.4	119.5	119.95	0.405
4*	116.2	124.1	120.15	31.205
5	133.4	133.0	133.20	0.08
6	130.1	129.1	129.60	0.5
7	133.1	132.1	132.60	0.5
8	128.8	129.3	129.05	0.125
9	129.3	130.3	129.80	0.5

* : Cochran の検定により棄却

解析結果

参加試験室数	9
データ解析に有効な試験室数	8
外れ値になった試験室数	1
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	130.6
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	0.6
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	1.7
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.5
室間再現標準偏差 SR (mg/kg)	5.5
室間再現許容差 $2.8SR$ (mg/kg)	15.5
室間再現相対標準偏差 $RSDR$ (%)	4.2
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSDR$ (%)	7.7
HorRatR	0.6

表 2 6 複数試験室での妥当性評価結果 (HPLC-UV : 小麦全粒粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	427.3	439.6	433.45	75.645
2	467.9	462.9	465.40	12.5
3	424.9	425.4	425.15	0.125
4	429.7	423.4	426.55	19.845
5	456.9	464.4	460.65	28.125
6	431.6	434.8	433.20	5.12
7	431.7	435.0	433.35	5.445
8	445.3	443.1	444.20	2.42
9	443.3	446.5	444.90	5.12

解析結果

参加試験室数	9
データ解析に有効な試験室数	9
外れ値になった試験室数	0
試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	441
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	4
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	12
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.9
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	15
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	41
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	3.3
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	6.4
HorRatR	0.5

表 2 7 複数試験室での妥当性評価結果 (HPLC・UV : ライ麦粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	1091.1	1072.2	1081.65	178.605
2	1159.2	1137.3	1148.25	239.805
3	1089.3	1100.6	1094.95	63.845
4	1081.1	1085.5	1083.30	9.68
5	1107.6	1109.8	1108.70	2.42
6	1071.2	1067.9	1069.55	5.445
7	1073.6	1066.3	1069.95	26.645
8	1086.9	1074.2	1080.55	80.645
9	1104.8	1089.9	1097.35	111.005

解析結果

参加試験室数	9
データ解析に有効な試験室数	9
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	1093
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	9
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	25
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.8
室間再現標準偏差 SR (mg/kg)	25
室間再現許容差 $2.8SR$ (mg/kg)	71
室間再現相対標準偏差 $RSDR$ (%)	2.3
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSDR$ (%)	5.6
HorRatR	0.4

表 2 8 平均値の差の検定 (抽出操作)

試料	等分散の検定 (F 検定) (有意水準 : 5%)			平均値の差の検定 (有意水準 ; 5%)		
	分散比	F 境界値	有意差	t 値	t 境界値	有意差
うるち玄米	0.322	0.304	あり	2.518	2.201	あり
コーンフラワー	1.040	3.677	なし	5.071	2.120	あり
小麦強力粉	0.032	0.287	なし	0.548	2.145	なし
小麦全粒粉	0.458	0.304	あり	0.108	2.179	なし
ライ麦粉	0.329	0.304	あり	1.359	2.201	なし

表 2 9 平均値の差の検定 (上澄み液の処理)

試料	等分散の検定 (F 検定) (有意水準 : 5%)			平均値の差の検定 (有意水準 ; 5%)		
	分散比	F 境界値	有意差	t 値	t 境界値	有意差
うるち玄米	8.623	3.677	あり	1.374	2.201	なし
コーンフラワー	1.912	3.677	なし	1.604	2.120	なし
小麦強力粉	14.531	3.787	あり	0.381	2.306	なし
小麦全粒粉	1.735	3.677	なし	0.546	2.120	なし
ライ麦粉	2.372	3.677	なし	1.711	2.120	なし

表 3 0 平均値の差の検定 (オートサンプラーのクーラー温度)

試料	等分散の検定 (F 検定) (有意水準 : 5%)			平均値の差の検定 (有意水準 ; 5%)		
	分散比	F 境界値	有意差	t 値	t 境界値	有意差
うるち玄米	3.699	3.204	あり	0.040	2.447	なし
コーンフラワー	1.912	3.677	なし	1.604	2.120	なし
小麦強力粉	1.708	3.482	なし	2.566	2.145	あり
小麦全粒粉	0.399	0.213	あり	1.574	2.131	なし
ライ麦粉	0.146	0.213	なし	0.163	2.120	なし

【工程表の②：LC-MS(MS)法の妥当性評価】

LC-MS/MS 法について、複数試験室での妥当性評価を実施し、成果目標を満たすことを確認した。以下に詳細を示す。

なお、装置は協力試験室の保有状況と単一試験室での LC-MS と LC-MS/MS での性能評価結果から、LC-MS/MS を用いることとした。

あらかじめ濃度を確認した 5 種の試料（うるち玄米粉、コーンフラワー、小麦強力粉、小麦全粒粉、ライ麦粉）を準備し、日清製粉グループ本社、昭和産業、キューピー、アサヒグループホールディングス、カゴメ、食品環境検査協会、日本穀物検定協会、日本食品分析センター彩都研究所、同多摩研究所内 2 試験室の計 10 試験室で次の手順により実施した。

- ・ 各試料の均質性確認は、それぞれ試料数 10、併行測定回数 2 回で実施し、技能試験の国際ハーモナイズドプロトコルの³⁾に記載の Recommendation 8 の手順により判定して「十分に均質」であることを確認した。
- ・ 各試料 N=2 分を 3 g ずつ採取したもの（計 10 試料）を、試料の種類を伏せて各試験室に配付して測定を行った。
- ・ 得られた測定値について図 18 のフローに従って外れ値の検定を行った後、一元配置の分散分析を行い、室間再現精度及び HorRat_R 値を算出した。

なお、試験に先立ち、弊財団東京本部で説明会を実施し、その際に各試験室から出された意見に基づき、単一試験室で実施した方法から以下の点について許容することとした。

- 抽出操作は、「振とう」または「攪拌」とする。
- 抽出後の上澄み液のろ過は、「遠心分離後」または「30 分間静置後」とする。
- HPLC のオートサンプラーのクーラー温度は、「4℃」、「10℃」または「室温（成行き）」とする（10℃の安定性は HPLC-UV 法の際に確認済み）。

各試験室の実施状況を表 3 1 に示した。

複数試験室での妥当性評価結果は、表 3 2～3 6 に示した通り、棄却データが小麦全粒粉で Cochran 検定により 1 試験室が外れ値と判定されたのみであり、データ解析に有効な試験室数として 9 が確保でき、HorRatR はいずれの試料においても 2 以下の良好な結果であった。

因みに、AOAC のシングルラボラトリーガイドライン²⁾の HorRatR の許容範囲は 0.5～2.0 であり、今回の妥当性評価において 0.5 を下回っている試料が 1 点あった。HorRatR が低い数値を示した場合は、分析法が簡便であったり、測定条件を揃えたりした結果であると考察される。今回の妥当性評価においてもこれらの要因が影響しているものと考えられた。

なお、試験室 1 において、オートランプレーのクーラー温度の逸脱（15℃）があったが、他の試験室の結果と比較して、特別低い値が認められなかったため、許容範囲であると考えられた。また、抽出操作に関しては、試験室 4 のみが攪拌であったため、統計的な比較はできなかった。

（平成 2 9 年度）

表 3 1 各試験室の試験操作と測定条件の違い (LC-MS/MS)

試験室		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
抽出		振とう	振とう	振とう	撈拌	振とう	振とう	振とう	振とう	振とう	振とう
上澄み液の処理		遠心 分離	遠心 分離	遠心 分離	静置	静置	遠心 分離	遠心 分離	静置	遠心 分離	遠心 分離
測定 条件	HPLC	Shimadzu NexeraX2	Shimadzu NexeraX2	Waters ACQUITY UPLC	Waters ACQUITY UPLC I-Class	Shimadzu Nexera	Shimadzu Nexera	Waters ACQUITY UPLC H-Class	Waters ACQUITY UPLC H-Class	Shimadzu Prominence	Agilent 1290
	MS/MS	AB SCIEX QTRAP4500	AB SCIEX QTRAP5500	Waters Xevo TQ-S	Waters Xevo TQ-S	AB SCIEX 4500	AB SCIEX QTRAP5500	Waters Xevo TQ-S micro	Waters Xevo TQD	Shimadzu LCMS-8030	AB SCIEX QTRAP4500
	分析カラム	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5	Discovery HS F5
	オートサンプラー のクーラー温度	15°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C

表 3 2 複数試験室での妥当性評価結果 (LC-MS/MS：うるち玄米粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	39.9	37.8	38.85	2.205
2	38.5	39.1	38.80	0.18
3	37.6	36.9	37.25	0.245
4	38.7	37.9	38.30	0.32
5	36.4	39.9	38.15	6.125
6	37.9	34.7	36.30	5.12
7	36.1	35.6	35.85	0.125
8	40.2	40.5	40.35	0.045
9	39.2	38.8	39.00	0.08
10	42.6	46.0	44.30	5.78

解析結果

参加試験室数	10
データ解析に有効な試験室数	10
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	38.7
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	1.4
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	4.0
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	3.7
室間再現標準偏差 SR (mg/kg)	2.6
室間再現許容差 $2.8SR$ (mg/kg)	7.2
室間再現相対標準偏差 $RSDR$ (%)	6.7
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSDR$ (%)	9.2
HorRatR	0.7

表 3 3 複数試験室での妥当性評価結果 (LC-MS/MS : コーンフラワー)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	103.6	101.5	102.55	2.205
2	100.7	103.0	101.85	2.645
3	98.0	101.1	99.55	4.805
4	99.6	99.8	99.70	0.02
5	101.1	96.0	98.55	13.005
6	101.8	96.0	98.90	16.82
7	103.7	108.0	105.85	9.245
8	106.4	106.8	106.60	0.08
9	102.3	104.2	103.25	1.805
10	106.1	102.7	104.40	5.78

解析結果

参加試験室数	10
データ解析に有効な試験室数	10
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	102.1
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	2.4
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	6.7
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.3
室間再現標準偏差 SR (mg/kg)	3.4
室間再現許容差 $2.8SR$ (mg/kg)	9.4
室間再現相対標準偏差 $RSDR$ (%)	3.3
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSDR$ (%)	8.0
HorRatR	0.4

表 3 4 複数試験室での妥当性評価結果 (LC-MS/MS：小麦強力粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	125.7	129.7	127.70	8
2	130.8	136.8	133.80	18
3	129.9	128.4	129.15	1.125
4	133.8	134.8	134.30	0.5
5	131.3	125.0	128.15	19.845
6	122.2	123.6	122.90	0.98
7	133.9	123.8	128.85	51.005
8	135.2	136.7	135.95	1.125
9	130.9	131.9	131.40	0.5
10	133.0	125.9	129.45	25.205

解析結果

参加試験室数	10
データ解析に有効な試験室数	10
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	130.2
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	3.6
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	10
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.7
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	4.6
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	12.8
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	3.5
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	7.7
HorRatR	0.5

表 3 5 複数試験室での妥当性評価結果 (LC-MS/MS：小麦全粒粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	337.3	338.4	337.85	0.605
2	347.3	358.0	352.65	57.245
3	341.8	341.0	341.40	0.32
4	319.4	312.0	315.70	27.38
5	316.9	329.0	322.95	73.205
6*	322.2	442.9	382.55	7284.245
7	328.6	302.3	315.45	345.845
8	364.5	372.0	368.25	28.125
9	338.1	333.4	335.75	11.045
10	336.0	327.7	331.85	34.445

* : Cochran の検定により棄却

解析結果

参加試験室数	10
データ解析に有効な試験室数	9
外れ値になった試験室数	1
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	336
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	8.0
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	22
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.4
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	18
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	51
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	5.4
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	6.7
HorRatR	0.8

表 3 6 複数試験室での妥当性評価結果 (LC-MS/MS : ライ麦粉)

試験室	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	797.6	833.5	815.55	644.405
2	826.2	893.5	859.85	2264.645
3	735.8	714.2	725.00	233.28
4	785.6	766.3	775.95	186.245
5	755.2	766.8	761.00	67.28
6	775.5	757.7	766.60	158.42
7	727.0	755.9	741.45	417.605
8	828.8	851.5	840.15	257.645
9	789.9	795.4	792.65	15.125
10	782.1	754.0	768.05	394.805

解析結果

参加試験室数	10
データ解析に有効な試験室数	10
外れ値になった試験室数	0
各試験室の併行測定回数	2
平均値 (mg/kg)	785
併行標準偏差 S_r (mg/kg)	22
併行許容差 $2.8S_r$ (mg/kg)	60
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.8
室間再現標準偏差 S_R (mg/kg)	45
室間再現許容差 $2.8S_R$ (mg/kg)	130
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	5.8
室間再現相対標準偏差 予測値 $PRSD_R$ (%)	5.9
HorRatR	1.0

(ウ) 成果目標に対する達成状況

成果目標を達成した。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中の）特許等を記述）

(1) 学術論文（別紙の（3）参照）

- ・ “HPLC-UV による穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発”、横関俊昭、西川佳子、小木曾基樹、藤田和弘、食品衛生学雑誌、58（6）、247-252、2017
- ・ “HPLC-UV による穀類中の遊離アスパラギン分析法の試験室間共同試験”、横関俊昭、土屋 仁、藤田和弘、食品衛生学雑誌、59（4）、in press、2018
- ・ “LC-MS および LC-MS/MS による穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発”、近宗雅人、猪之鼻修一、横関俊昭、土屋 仁、藤田和弘、食品衛生学雑誌、59（5）、in press、2018

(2) 学会発表（別紙の（4）参照）

- ・ “UV-HPLC 法による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルの開発①”、横関俊昭、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016 年 10 月
- ・ “UV-HPLC 法による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルの開発②”、藤田和弘、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016 年 10 月
- ・ “LC-MS による穀類中の遊離アスパラギン分析法プロトコルの開発”、近宗雅人、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017 年 11 月

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

研究開始当初、中課題として「GC-FID による穀類中の遊離アスパラギンの分析法開発」を設けていたが、HPLC-UV 法の複数試験室の妥当性評価に参加した機関（本研究で開発した分析法の利用が想定される製粉メーカー等）から、現場の保有機器等を踏まえると本分析法を開発する必要性は低いとの意見が出されたため、試験研究課題運営チームと協議の上、研究課題から除外した。それ以外の目標の達成に関する問題点等はない。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	アクリルアミド濃度の目安となる指標等の開発(穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルの開発)
---------	---

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
2701-2	6	有	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	第1回推進会議	2015年6月25日	農林水産省 共用第一会議室 (本館地下 ドアNo.本039-1)	11	有	3年計画の事業概要について説明及び内容の討議
①	第2回推進会議	2016年2月18日	農林水産省 消費・安全局第2会議 室(本館1階 ドアNo.本143)	9	有	27年度事業の進捗状況の説明及び内容の討議
①	第1回推進会議	2016年6月14日	農林水産省 共用第三会議室 (本館1階 ドアNo.本145)	10	有	28年度計画の事業概要について説明及び内容の討議
③	HPLC-UV法の複数試験室で の妥当性確認試験説明会	2016年6月21日	日本食品分析センター 新館 3階 第一会議室	15	有	HPLC-UV法の妥当性確認試験の説明及び討議
①	第2回推進会議	2017年3月1日	農林水産省 共用第四、五会議室(本 館地下1階 ドアNo.本003)	9	有	28年度事業の進捗状況の説明及び内容の討議
①	第1回推進会議	2017年6月23日	農林水産省 共用第四会議室(本館地 下1階 ドアNo.本003)	11	有	29年度計画の事業概要について説明及び内容の討議
③	LC-MS/MS法の複数試験室 での妥当性確認試験説明会	2017年10月17日	日本食品分析センター 新館 3階 第一会議室	13	有	LC-MS/MS法の妥当性確認試験の説明及び討議
①	第2回推進会議	2018年2月19日	農林水産省 共用第四、五会議室(本 館地下1階 ドアNo.本003)	10	有	29年度事業の進捗状況の説明及び内容の討議

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコル	食品関連事業者が参照可能	農林水産省において分析法プロトコルの確認中
②	LC-MS(/MS)による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコル	食品関連事業者が参照可能	農林水産省において分析法プロトコルの確認中

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
“HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発”、横関俊昭、西川佳子、小木曾基樹、藤田和弘、食品衛生学雑誌、58(6)、247-252、2017	一般財団法人日本食品分析センター
“HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギン分析法の試験室間共同試験”、横関俊昭、土屋 仁、藤田和弘、食品衛生学雑誌、59(4)、in press、2018	一般財団法人日本食品分析センター
“LC-MSおよびLC-MS/MSによる穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発”、近宗雅人、猪之鼻修一、横関俊昭、土屋 仁、藤田和弘、食品衛生学雑誌、59(5)、in press、2018	一般財団法人日本食品分析センター

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
UV-HPLC法による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルの開発①、横関俊昭、第112回日本食品衛生学会学術講演会、2016年10月	一般財団法人日本食品分析センター
UV-HPLC法による穀類中の遊離アスパラギンの分析法プロトコルの開発②、藤田和弘、第112回日本食品衛生学会学術講演会、2016年10月	一般財団法人日本食品分析センター
LC-MSによる穀類中の遊離アスパラギン分析法プロトコルの開発、近宗雅人、第113回日本食品衛生学会学術講演会、2017年11月	一般財団法人日本食品分析センター

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考