

平成30年3月27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：2901

「油脂を用いた加熱調理が、食材中の 3-MCPD 脂肪酸エステル類及びグリシドール脂肪酸エステル類の生成に及ぼす影響を把握するための分析法の開発」

研 究 期 間：平成29年度（1年間）

研究総括者名：神山 和夫

試験研究機関名：ハウス食品グループ本社株式会社

目次

1	研究目的	4
2	研究内容	5
(1)	研究課題	5
1)	中課題 1 : 加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立	5
2)	中課題 2 : 加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明	6
(2)	年次計画	7
(3)	実施体制	8
3	研究推進会議の開催状況	8
4	研究成果の概要	8
(1)	主要な成果	8
ア	成果の内容 (別紙の (2) 参照)	8
イ	成果の活用 (別紙の (2) 参照)	9
(2)	各研究課題の成果	9
1 章	確立した分析法 (EFSA 法 ^{1, 2)} の改良)	15
1-1.	器具及び装置	15
1-2.	試薬	15
1-3.	調製試薬	16
1-4.	標準・内標準試薬の調製	17
1-5.	試料調製	18
1-6.	GC-MS	22
1-7.	定量	23
1-8.	GC-MS クロマトグラム	24
2 章	確立した分析法 (酵素法 ^{4 5)} の改良)	26
2-1.	器具及び装置	26

2-2. 試薬	26
2-3. 調製試薬	27
2-4. 標準・内標準試薬の調製.....	27
2-5. 試料調製	28
2-6. GC-MS	30
2-7. 定量	31
2-8. 食品中の脂質濃度の推定.....	32
2-9. GC-MS クロマトグラム.....	33
3 章. 中課題 1：加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立	35
3-1. 性能評価の方法.....	35
3-2. 【小課題 1-1, 1-2】EFSA 法の検討.....	39
3-3. 【小課題 1-3】酵素法の検討.....	46
3-4. 【小課題 1-1, 1-2】EFSA 法と【小課題 1-3】酵素法の性能評価	48
3-5. 【小課題 1-1, 1-2】EFSA 法と【小課題 1-3】酵素法の分析値比較.....	54
3-6. 中課題 1 の要約	58
4 章. 中課題 2：加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明.....	60
4-1. 【小課題 2-1】試料作製.....	60
4-2. 【小課題 2-2】加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成への温度、時間の影響の把握.....	63
4-3. 【小課題 2-3】加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成に寄与する要因の特定	75
4-4. 中課題 2 の要約	91
【参考文献】	93
5 研究成果の発表.....	94
6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等	94

1 研究目的

これまでの農林水産省による実態調査結果より、3-モノクロロプロパンジオール脂肪酸エステル類（3-MCPDE）、グリシドール脂肪酸エステル類（GE）は、食用油脂、及び油脂の含有率が高い食品に含まれることが報告されている。食用油脂中のこれらの物質については多くの研究が行われ、油脂の精製時の脱臭工程にて生成することや、増加に影響する主要因が明らかになっている。食用油脂を対象とした分析法は、複数試験室間で性能評価した方法が存在する。

一方、食品の加熱調理時における 3-MCPDE、GE の動態は明らかになっておらず、食品の加熱調理時にこれらの物質が増加するか否かも不明である。日本に流通する幅広い加工食品に適することを評価した分析法も存在しない。そこで、本研究は下記の 2 点を達成することを目的とした。

(1) 加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立

欧州にて食品中の 3-MCPDE、GE 含有実態調査に使用されている、欧州食品安全機関が報告した酸間接分析法（EFSA 法）¹の性能を評価し、適用範囲外であった食品に対しては EFSA 法の操作を改良する。

また、基準油脂分析試験法が引用する酵素的間接分析法（酵素法）の性能を評価する。これらにより、日本国内に流通する食品中の 3-MCPDE、GE の含有実態調査や、製造者、検査機関による自主検査を行う場合等に利用可能な、精度、及び作業効率が良い（迅速、簡便）分析法を提案する。

(2) 加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明

加熱調理中の 3-MCPDE、GE の生成の有無、及び生成に寄与する要因を明らかとするため、実験に適したモデル加工食品を作製する。「揚げ」、「焼き」の 2 種類の加熱調理において、汎用的な加熱条件、及び過酷条件で加熱したモデル加工食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析することで、これら物質の生成に影響する温度、時間を特定する。次いで、モデル加工食品中の塩濃度、原料油脂の種類、pH 等を変更し、加熱の前、後で 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を変化させる要因を特定する。これにより、3-MCPDE、GE が生成しやすい加熱調理条件、食品を絞り込み、製造者による製造工程、家庭調理における予防策の基礎データを取得し、提案する。

¹ EFSA 法は、研究開始当初に公表されていた分析法¹⁾に加え、研究実施期間中に、試料の前処理に固相抽出操作等を追加した改良法が公表された²⁾。前者の分析法を「EFSA 法 15 年版」、後者の分析法を「EFSA 法 17 年版」とする。その後、試験室間共同試験の結果が公表された³⁾。試験室間共同試験に用いられた分析法を「EFSA 法 18 年版」とする。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題 1：加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立

食品中の 3-MCPDE、GE 分析への EFSA 法の適用可能性を評価し、必要に応じて、改良法を開発する。合わせて、EFSA 法よりも迅速な酵素法の適用可能性を評価し、より作業効率が良い分析法として提案する。EFSA 法、酵素法の概略フローを表 I に示す。

表 I. EFSA 法（左）、酵素法（右）の概略フロー。EFSA 法は、食品試料の脂質抽出・脱水が必須である。酵素法は、高脂質食品であれば脂質抽出・脱水が不要である。

EFSA 法		酵素法		
脂質濃度が 5%を超える食品	脂質濃度が 5%以下の食品	試料	脂質濃度が 50%以上の食品 (マーガリン、マヨネーズ等)	脂質濃度が 50%以下の 副原料が多い食品 (調製粉乳等)
↓	↓		↓	↓
高压溶媒抽出 (PLE)	脂質抽出 脱水			液液分配
臭素化 50℃、15 分間	加水分解 臭素化	リパーゼ・臭化ナトリウム水溶液 室温～40℃、30 分間		
硫酸・メタノール溶液 40℃、16 時間				
フェニルボロン酸	誘導体化	臭素化 80℃、10 分間		
GC-MS	分析	フェニルボロン酸		
		GC-MS		

※太枠内は基準油脂分析試験法 2.4.14-2016⁴⁾

小課題 1-1. EFSA 法の性能評価

EFSA 法（表 I：左）の適用可否を判断するため、研究課題運営チームと共に選定した加工食品を試料として用いる。3-MCPDE、GE 標準試薬を用いた添加回収試験の結果から、食品毎に EFSA 法の適用可否を判断し、適用可能な食品の範囲を明確にする。適用可能であった食品に対しては、EFSA 法の精度（併行、日間）、検出限界、及び定量限界を算出し、性能を評価する。

小課題 1-2. EFSA 法の改良

小課題 1-1 の結果、EFSA 法が適用できなかった食品について、その原因を究明し、改良を行うべき操作を特定する。食品中の夾雑成分の除去が不十分である場合には、夾雑成分を除去するための前処理を追加する。食品からの 3-MCPDE、GE の抽出が不十分である場合には、抽出条件を改良（溶媒、抽出操作の変更）する。改良した方法に対して、精度、検出限界、及び定量限界を算出し、性能を評価する。

小課題 1-3. 酵素法の提案

食用油脂を対象とした 3-MCPDE、GE の間接分析法である酵素法（表 I：右太枠内）は、試験室間共同試験を経て、日本油化学会 基準油脂分析試験法 2.4.14-2016⁴⁾として登録

された。その後、油脂を含む食品を対象とした酵素法（表 I：右）が開発され、論文発表された⁵⁾。食用油脂の分析において、酵素法は、米国油化学会（AOCS）Official method Cd29a⁶⁾、Cd29b⁷⁾、Cd29c⁸⁾と比べて迅速かつ簡便な手法である。油脂を含む食品の分析においても、EFSA 法は臭素化、加水分解が水の存在により干渉されるため脂質抽出、脱水操作が必須であるが、酵素法は水系の加水分解であるため試料中の水の影響を受けにくく、高脂質食品であれば脂質抽出は不要である。

酵素法についても適用可能な食品の範囲、性能を評価する。次いで、酵素法、EFSA 法、及び改良した EFSA 法を用いて得られた分析値を統計的に比較する。方法間で分析値の同等性を示せた場合、迅速かつ簡便な新規分析法として、酵素法を提案する。

2) 中課題 2：加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明

3-MCPDE、GE は、主に食用油脂の精製時の脱臭工程にて生成することが報告されている。3-MCPDE の生成には塩化物が必要であること、GE の生成には、部分アシルグリセロール（ジアシルグリセロール（DAG）、モノアシルグリセロール（MAG））が基質となること、脱臭温度が 200℃付近までは生成と分解が拮抗し、220℃以上の高温下で生成が優位に起こることが報告されている。食用油脂の製造中の 3-MCPDE、GE 生成の主要因、低減策は明らかになりつつある。

一方、油脂を原料とする食品の加熱調理における 3-MCPDE、GE の動態は明らかになっていない。そこで、加熱調理の場面を想定して、3-MCPDE、GE の動態の解明に適したモデル加工食品を作製する。加熱前後のモデル加工食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析し、これら物質の増減に影響する主要因を特定する。

小課題 2-1. 試料作製

モデル加工食品として、試料内の均質性が確保でき、配合の変更が容易にできる試料形態（例：成型ポテトスナック、クッキー等）を選定し、作製する。モデル加工食品は、加熱の前、後の各試料を無作為に 5 試料選定し、繰り返し 2 回分析する。分析値を統計的に解析し、均質性を評価する。

小課題 2-2. 加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成への温度、時間の影響の把握

加熱調理前、後のモデル加工食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析し、これら物質の生成の有無、及びこれら物質が生成する温度、時間を把握する。加熱調理は「揚げ」、「焼き」の 2 種類を実施する。加熱条件は、製造工程、家庭調理で一般的に用いられる汎用的な条件と、高温、長時間の過酷条件を用いる。

「揚げ」は、加熱器具として業務用フライヤーを用いる。モデル加工食品は、140～200℃の温度範囲内の複数点毎に、揚げ時間 0.5～5 分で経時的に加熱する。これら試料中の 3-MCPDE、GE の濃度を分析し、3-MCPDE、GE が生成しやすい温度、時間を把握する。また、揚げ油中の 3-MCPDE、GE の濃度も分析する。

「焼き」は、加熱器具としてオーブン、ホットプレート、IH ヒーター等から選定する。

「揚げ」と同様に、モデル加工食品は、100℃～加熱器具の最高温度の複数点毎に、焼き時間 1～30 分で経時的に加熱する。これら試料の 3-MCPDE、GE の濃度を分析する。3-MCPDE、GE が生成しやすい温度、時間を把握する。

小課題 2-3. 加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成に寄与する要因の特定

食用油脂の精製時の 3-MCPDE、GE 生成には、温度、時間に加えて、塩化物の有無、油種等の要因が寄与することが報告されている。本研究では、塩濃度、原料油脂及び揚げ油の種類、pH 等の各要因を変更したモデル加工食品を作製する。加熱温度は、小課題 2-2 で使用した汎用的な条件と過酷条件の 2 点とする。各モデル加工食品の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析し、生成に寄与する要因を特定する。加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成要因を明らかとし、生成を制御する方法を提案する。

(2) 年次計画

[illegible]

(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	ハウス食品グループ本社	神山 和夫		5.2
中課題 1 : 加熱調理された食品中 3-MCPDE、GE 分析法の確立	ハウス食品グループ本社	○	宮崎 絹子	16.5
(1) EFSA 法の性能評価	同上	△	同上	前出
(2) EFSA 法の改良	同上	△	同上	前出
(3) 酵素法の提案	同上	△	同上	前出
中課題 2 : 加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明	ハウス食品グループ本社	○	宮崎 絹子	20.7
(1) 試料作製	同上	△	同上	前出
(2) 加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成への温度、時間の影響の把握	同上	△	同上	前出
(3) 加熱調理中の 3-MCPDE、GE 生成に寄与する要因の特定	同上	△	同上	前出

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△を付すこと。

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) 加工食品中の 3-MCPDE・GE 分析法の単一試験室における妥当性確認 (EFSA 法)

欧州食品安全機関が報告した酸間接分析法 (EFSA 法) について、油脂を用いた加熱調理を経て製造される加工食品への適用の可否を確認し、適用できなかった食品については分析法に一部改良を加えた。改良を加えた分析法について、単一試験室で性能を評価し、5 種類の加工食品について十分な精度で分析が可能であることを確認した。

(イ) 加工食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の単一試験室における妥当性確認 (酵素法)

日本油化学会基準油脂分析試験法が引用する酵素的間接分析法 (酵素法) について、油脂を用いた加熱調理を経て製造される加工食品への適用の可否を確認し、適用できなかった食品については分析法に一部改良を加えた。改良を加えた分析法について、単一試験室で性能を評価し、5 種類の加工食品について十分な精度で分析が可能であることを確認した。

また、13 食品試料中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度について、本分析法による分析値と、(ア)で改良した EFSA 法による分析値を統計的に比較し、有意差がないことを確認した。

(ウ) 加熱調理が加工食品中の 3-MCPDE、GE 生成に及ぼす影響について基礎データの収集
揚げ調理・焼き調理のモデル加工食品として揚げスナック、焼きクラッカーを作成し、加熱前後での 3-MCPDE、GE の増減を調べた結果、汎用的な加熱条件では両物質ともに増加しなかった。また、塩分濃度、pH、原料油種が、加熱調理中の 3-MCPDE、GE の生成に及ぼす影響に関する基礎データを収集した。

イ 成果の活用（別紙の（２）参照）

(ア) 加工食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の単一試験室における妥当性確認（EFSA 法）

(イ) 加工食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の単一試験室における妥当性確認（酵素法）

(ウ) 加熱調理が加工食品中の 3-MCPDE・GE 生成に及ぼす影響についての基礎データ収集

本研究で得られた成果をもとに、油脂を用いた加熱調理が加工食品中の 3-MCPDE、GE 生成に及ぼす影響についてさらに知見を収集し、油脂を使用した幅広い加工食品に含まれる 3-MCPDE、GE の実態調査の必要性の判断に活用する。また、これらの分析法について、必要に応じて複数試験室間での妥当性を確認した上で、加工食品中の 3-MCPDE、GE の実態調査に活用する。

（２）各研究課題の成果

中課題 1「加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立」の研究成果

中課題 1 では、日本国内に流通する加工食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析するため、既存の分析法の改良を行うとともに、性能を評価した。

1 章に EFSA 法を元に改良した分析法、2 章に酵素法を元に改良した分析法を示す。3 章では、分析法を確立するまでの検討事例（検証・改良）及び両分析法の性能評価の結果と、同等性評価の結果を述べる。

工程表	成果
①添加回収試験により、EFSA 法及び酵素法の幅広い加工食品への適用可否を判断する。適用可能であった食品について、これら分析法の性能を評価する。 [小課題 1-1、小課題 1-3]	対象の 5 食品（揚げせんべい、鶏から揚げ、揚げ即席麺、ビスケット、天ぷら）について、EFSA 法、酵素法の適用性を確認した。適用に当たっての課題が見つかった場合は、原因の特定、分析法の改良を行った。
②EFSA 法の適用範囲外であった食品については、適用可能な改良法を開発する。 [小課題 1-2]	改良した EFSA 法、改良した酵素法について、各食品 $n=5$ で 4 日間分析し、性能を評価したところ、ともに添加回収率 80～110% 内、 HorRat_{ω} 値 $[(\text{室内再現精度})/(\text{Horwitz 式を用いた推定室間再現精度} \times 2/3)]$ は 2 未満と良好であった。
↓	↓

③改良した EFSA 法と改良した酵素法の分析値の統計的な比較をする。性能評価と分析値比較の結果が良好であれば、酵素法を食品中のこれら物質の分析法として提案する。 [小課題 1-3]	全 14 食品試料中の 3-MCPDE、GE について、両分析法の分析値を統計的に比較した。改良した EFSA 法については、揚げ即席麺のみ 15 年版、それ以外の 13 食品は 17 年版による分析値を比較に用いた。 t 検定 揚げ即席麺を除く 13 食品試料で、食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度に有意差は見られなかった。揚げ即席麺では 3-MCPDE 濃度のみ有意差が見られた。 JIS Z 8402-6 : 2 つの方法の平均値の比較 全 14 食品試料とも、両分析法間で分析値に統計的な差がないことが示された。 重み付きデミング回帰分析 傾きと切片の 95%信頼区間がそれぞれ 1、0 を含んでいたことから、両分析法の分析値は同等であることが示された。 EFSA 法は 1 分析に 2～3 日を要するのに対し、酵素法は 1 分析が 1 日で完了し、迅速である。 本研究では、食品中の 3-MCPDE、GE の分析法として、EFSA 法に加えて、作業効率が良い酵素法を提案できた。
成果目標： ・加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法を確立するため、EFSA 法の性能評価を行い、必要に応じて改良する。 ・食品中の 3-MCPDE、GE の分析法として、作業効率が良い（迅速、簡便）分析法を提案する。	
成果目標に対する達成状況： ・EFSA 法及び酵素法について、加工食品に適用できるかを確認し、適用できなかった食品については一部改良を加えた。改良を加えた分析法について、単一試験室で性能を評価し、5 種類の食品について十分な精度で分析が可能であることを確認した。 ・また、両分析法による 13 食品試料中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の分析値に統計的に有意な差異がないことを示し、加工食品中の 3-MCPDE、GE の分析法として、EFSA 法と比べて作業効率が良い酵素法が使用可能であることを確認した。	

中課題 2「加熱調理における 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因の解明」

中課題 2 では、加熱調理中の 3-MCPDE、GE の生成の有無、及び生成に寄与する要因を明らかにするため、「揚げ」、「焼き」の 2 条件の加熱調理におけるモデル加工食品を作製した。モデル加工食品の加熱条件（温度、時間）、及び原材料を変更し、加熱調理の前、後で 3-MCPDE、GE の増減に影響する要因を確認した。4 章に結果を述べる。

工程表	成果
①加熱調理における食品中の 3-MCPDE、GE の動態解明に適し、かつ均質性が確保された試料を作製する。 [小課題 2-1] ↓ ② “製造工程、家庭調理を想定した代表的な加熱条件における 3-MCPDE、GE の生成の有無” や “3-MCPDE、GE が生成する温度、時間帯” を特定する。 [小課題 2-2]	「揚げ」、「焼き」のモデル加工食品として、揚げポテトスナック、焼きクラッカーを選定・作製した。作製したモデル加工食品の均質性を確認した。 ↓ 揚げスナック、焼きクラッカーともに、汎用的な加熱条件では、3-MCPDE、GE は増加しなかった。 揚げスナック 油種：パーム油 加熱条件：140、160、180、190℃ ・ 汎用的な条件 160℃ ・ 過酷条件 180、190℃ 加熱時間：30～98 秒 Control 品の条件：160℃、45 秒 汎用的な条件で作製した揚げスナックでは、3-MCPDE、GE の増減はなかった。過酷条件では、揚げスナック中の 3-MCPDE は減少し、GE は長時間（68～98 秒）加熱した場合にやや減少した。 揚げスナック作成時の揚げ油 本研究の揚げ加熱は、バッチ式で行った。揚げ油（パーム油）中の 3-MCPDE 濃度は、揚げスナック加熱時に、経時的に減少した。揚げ油中の 3-MCPDE 濃度の減少の一因として、「水分の存在」が示唆された。

	焼きクラッカー 油種：パーム油 加熱条件：185、200、240℃ ・汎用的な条件 185、200℃ ・過酷条件 240℃ 加熱時間：10～30 分 Control 品の条件：200℃、20 分 焼きクラッカー中の 3-MCPDE、GE は、汎用的な条件での加熱では増加しなかった。過酷条件での加熱では、3-MCPDE は著しく増加し、GE は減少した。 3-MCPDE が増加した焼きクラッカーは、水分濃度が 0.3%未満で、外観は焦げ、喫食できないレベルであった。
↓ ③温度、時間以外に 3-MCPDE、GE 生成に影響を及ぼす要因を特定する。 [小課題 2-3]	↓ 揚げスナック 加熱条件：160、190℃ ・汎用的な条件 160℃ ・過酷条件 190℃ 加熱時間：30～68 秒 小課題 2-2 の揚げスナック基本配合の 【配合水の NaCl 濃度】、 【配合水の pH】、 【油種（米油）】 を変更した揚げスナックを作製した。 【配合水の NaCl 濃度：2、5、10%(w/v)】 揚げスナック中の 3-MCPDE は、汎用的な条件で加熱した場合は、NaCl の添加の有無によらず増減がみられなかった。過酷条件で加熱した場合は、NaCl 無添加の時は減少し、配合水の NaCl 濃度が 2%及び 5%の場合は増減せず、10%の場合はわずかに増加した。一方、揚げスナック中の GE は、汎用的な条件、過酷条件のいずれも、配合水の NaCl 濃度が

	高くなるに従い減少した。特に、190℃では減少率が大きかった。 NaCl 存在下で加熱した場合、揚げスナック中では、加熱による 3-MCPDE の減少と、GE から 3-MCPDE への変換の両方が生じる可能性が示唆された。 【配合水の pH : 3、5、7、9】 揚げスナック中の 3-MCPDE には、配合水の pH 変化による大きな増減は見られなかった。一方、揚げスナック中の GE は、pH9 ではわずかに増加し、pH 3 では減少した。 【油種（米油）】 揚げスナック：生地への配合油脂及び揚げ油を米油に変更した場合、揚げスナック中の 3-MCPDE、GE の増減に、パーム油を用いた場合との大きな違いはなかった。揚げスナック中の 3-MCPDE は、汎用的な条件では大きな増減は見られず、過酷条件では減少した。揚げスナック中の GE は、汎用的な条件・過酷条件ともに増減しなかった。 揚げ油：パーム油を用いた場合と同様に、揚げ油中の 3-MCPDE 濃度は揚げスナックの作製中に経時的に減少し、GE 濃度は増減しなかった。 実験系：ガラス繊維濾紙 【水分】 水分を含ませたガラス繊維濾紙を、160、190℃のパーム油で揚げた場合、揚げ油中の 3-MCPDE 濃度は減少した。GE 濃度は、160℃では増減せず、190℃では減少した。160、190℃での加温のみを行ったパーム油では、3-MCPDE 濃度、GE 濃度ともに増減しなかった。
--	--

	→食品試料に含まれる水分は、揚げ油中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を減少させる一因 であると推測された。
成果目標： 3-MCPDE、GE が生成しやすい食品の範囲や加熱調理条件を絞り込み、製造者による製造工程、家庭調理でのこれら物質の生成予防策を提案する。	
成果目標に対する達成状況： 2 種類のモデル加工食品を用いた実験の結果、揚げ調理・焼き調理ともに、汎用的な温度・時間での加熱では 3-MCPDE、GE は増加しないことを明らかにした。	

1 章. 確立した分析法 (EFSA 法^{1,2)} の改良)

EFSA 法は、食品試料中の 3-MCPDE 及び GE を、高圧溶媒抽出 (PLE) により、脂質とともに抽出する。抽出した脂質中の 3-MCPDE を酸条件下のメタノリシスにより 3-モノクロロ-1,2-プロパンジオール (3-MCPD) へ、GE を臭素化及び酸条件下のメタノリシスにより 3-モノブromo-1,2-プロパンジオール (3-MBPD) へと変換する。変換して得られた 3-MCPD 及び 3-MBPD を誘導体化して GC-MS にて分析し、抽出した脂質中の 3-MCPDE、GE を、それぞれ遊離型の 3-MCPD 当量、グリシドール当量として定量する。脂質中の 3-MCPDE 濃度 (3-MCPD 当量)、GE 濃度 (グリシドール当量) に、食品中の脂質濃度を乗じることにより、食品試料中の 3-MCPDE 濃度 (3-MCPD 当量)、GE 濃度 (グリシドール当量) を算出する。本研究において EFSA 法 15 年版¹⁾又は 17 年版²⁾から変更・追加した操作の記述には、下線を引いた。

1-1. 器具及び装置

- 1-1-1. 褐色メスフラスコ (10 mL 容、20 mL 容、50 mL 容、100 mL 容)
- 1-1-2. ホールピペット又はガラス製マイクロシリンジ
- 1-1-3. マイクロピペット
- 1-1-4. ガラス製パスツールピペット
- 1-1-5. スクリューキャップ付ガラス製褐色試験管 (10 mL 容)
- 1-1-6. ガラス製遠沈管又はポリプロピレン製ファルコンチューブ (30 mL 容又は 50 mL 容)
- 1-1-7. 恒温水槽
- 1-1-8. ボルテックスミキサー
- 1-1-9. 遠心分離機
- 1-1-10. 超音波洗浄器
- 1-1-11. 固相抽出、3 mL カートリッジ、充填剤量 500 mg、充填剤 アミノプロピル (NH₂) : HyperSep™ (Thermo Fisher Scientific)
- 1-1-12. 窒素吹付けユニット付ドライサーモユニット (タイテック)
- 1-1-13. 高圧溶媒抽出 (PLE) 装置 : 高速高圧抽出装置 E-916 (Speed Extractor)
(日本ビュッヒ)
 - 1-1-13-1. セル (40 mL 容)
 - 1-1-13-2. 溶媒捕集ビン
- 1-1-14. ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)
 - 1-1-14-1. ガスクロマトグラフ : TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific)
 - 1-1-14-2. 質量分析計 : TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific)
- 1-1-15. GC カラム : VF-5ms、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm (Agilent Technologies)

1-2. 試薬

- 1-2-1. ポリアクリル酸ナトリウム、粒度 90~850 µm (シグマ アルドリッチ)
- 1-2-2. 石英砂、粒度 50-70 mesh (シグマ アルドリッチ)

- 1-2-3. *tert*-ブチルメチルエーテル、残留農薬用又は高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業）
- 1-2-4. ヘキサン、特級（和光純薬工業）
- 1-2-5. 酢酸エチル、特級（和光純薬工業）
- 1-2-6. 無水テトラヒドロフラン、特級（和光純薬工業）
- 1-2-7. メタノール、特級（和光純薬工業）
- 1-2-8. トルエン、特級（和光純薬工業）
- 1-2-9. 2,2,4-トリメチルペンタン（イソオクタン）（和光純薬工業）
- 1-2-10. ジエチルエーテル、特級（和光純薬工業）
- 1-2-11. 硫酸、純度 $\geq 95\%$ （関東化学）
- 1-2-12. 炭酸水素ナトリウム、純度 $\geq 99\%$ （和光純薬工業）
- 1-2-13. 硫酸ナトリウム、無水、粒状、純度 $\geq 99\%$ （和光純薬工業）
- 1-2-14. 硫酸アンモニウム、純度 $\geq 99\%$ （和光純薬工業）
- 1-2-15. フェニルボロン酸（PBA）、純度 $\geq 97\%$ （東京化成工業）
- 1-2-16. 臭化ナトリウム、純度 $\geq 99.5\%$ （和光純薬工業）
- 1-2-17. 標準、内標準試薬
 - 1-2-17-1. 3-MCPD ジパルミタート（3-MCPD-P/P）（和光純薬工業）
 - 1-2-17-2. グリシジルパルミタート（G-P）（和光純薬工業）
 - 1-2-17-3. 3-MCPD ジパルミタートの重水素標識体（3-MCPD-P/P- d_5 ）（和光純薬工業）
 - 1-2-17-4. グリシジルオレアートの重水素標識体（G-O- d_5 ）（Toronto Research Chemicals）
- 1-2-18. ガス
 - 1-2-18-1. ヘリウム（純度 99.999%）：GC-MS 用
 - 1-2-18-2. 窒素（純度 99.999%）：PLE 装置用

1-3. 調製試薬

- 1-3-1. 3 mg/mL 臭化ナトリウム・硫酸水溶液（用時調製）：臭化ナトリウム 1 g を超純水 10 mL に溶解する（臭化ナトリウム水溶液）。10 mL 容メスフラスコに臭化ナトリウム水溶液 0.18 mL 及び超純水 5.5 mL を採取する。その後、硫酸 0.3 mL を加え、蓋を閉め、よく混合した。
- 1-3-2. 0.6% (w/v) 炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 0.6 g を 100 mL 容褐色メスフラスコにはかり取った。超純水で定容後、超音波洗浄器を用いて、完全に溶解させた。
- 1-3-3. 1.8% (v/v) 硫酸・メタノール溶液（用時調製）：100 mL 容褐色メスフラスコにメタノール 50 mL を加えた。その後、硫酸 1.8 mL を採取し、メタノールで定容した。
- 1-3-4. 飽和炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 4.8 g を 50 mL 容褐色メスフラスコにはかり取った。超純水で定容後、超音波洗浄器を用いて、完全に溶解させた。

1-3-5. 硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム 20 g を 50 mL 容褐色メスフラスコにはかり取った。超純水で定容後、超音波洗浄器を用いて、完全に溶解させた。

1-3-6. フェニルボロン酸（PBA）溶液：PBA 0.4 g をジエチルエーテル 10 mL に溶解した。

1-4. 標準・内標準試薬の調製

1-4-1. 標準・内標準ストック溶液

約 1 mg/mL 3-MCPD-P/P 標準・トルエン溶液：3-MCPD-P/P 標準試薬 10±0.1 mg を 10 mL 容褐色メスフラスコに採取し、トルエンで定容した。定容前・後のメスフラスコの重量は、秤量天秤を用いて計測し、トルエンの添加重量を算出した。トルエンの密度を 867 kg/m³ として、3-MCPD-P/P・トルエン溶液の濃度を算出した。

G-P 標準試薬、3-MCPD-P/P-*d*₆ 内標準試薬及び G-O-*d*₆ 内標準試薬も同様に希釈し、約 1 mg/mL の各ストック溶液を調製した。分析種間の変換を防ぐため、混合せず、単一成分のストック溶液とした。本研究の間、-20℃で 6 か月間保存した。

1-4-2. 内標準（3-MCPD-P/P-*d*₆ 及び G-O-*d*₆）混合溶液（15 年版を参考にした）

3-MCPD-P/P-*d*₆ 及び G-O-*d*₆ 内標準の各ストック溶液 0.5 mL をホールピペット又はガラス製マイクロシリンジを用いて 20 mL 容褐色メスフラスコに採取し、トルエンで定容した。本研究の間、-20℃で 6 か月間保存した。

1-4-3. 標準（3-MCPD-P/P 及び G-P）混合溶液

1-4-3-1. 揚げ即席麺の分析に用いる標準混合溶液（15 年版を参考にした）

下記の標準混合溶液を調製した。

標準混合溶液 I：3-MCPD-P/P ストック溶液、G-P ストック溶液 [1-4-1] を 0.25 mL ずつガラス製マイクロシリンジを用いて 50 mL 容褐色メスフラスコに採取し、トルエンで定容した。

標準混合溶液 II：ホールピペットを用いて標準混合溶液 I 1 mL を 10 mL 容褐色メスフラスコに採取し、トルエンで定容した。

1-4-3-2. 揚げ即席麺以外の食品の分析に用いる標準混合溶液（17 年版を参考にした）

3-MCPD-P/P ストック溶液 2.5 mL 及び G-P ストック溶液 1.25 mL を、ガラス製マイクロシリンジを用いて 50 mL 容メスフラスコに採取し、トルエンで定容し、混合溶液を調製した。

混合溶液をガラス製マイクロシリンジ及びホールピペットを用いて 0.1、1、2、3、4 mL ずつ 10 mL 容メスフラスコに採取し、トルエンで定容した。それぞれの溶液を Cal 1、Cal 2、Cal 3、Cal 4、Cal 5 とした（表 1-1）。

表 1-1. 標準混合溶液の調製

	3-MCPD-P/P、G-P 混合溶液の採取量	定容量
Cal 1	0.1 mL	10 mL
Cal 2	1 mL	10 mL
Cal 3	2 mL	10 mL
Cal 4	3 mL	10 mL
Cal 5	4 mL	10 mL

1-5. 試料調製

EFSA法では、酸条件下でGEを臭素化して3-MBPDEへと変換するが、15年版では、試料由来のモノアシルグリセロール（MAG）、ジアシルグリセロール（DAG）からも3-MBPDEが生成することが報告された⁹⁾。17年版では、MAG、DAGを除去するため、臭素化前に固相抽出が追加された。本研究の実施中にEFSA法の17年版が公表されたため、15年版はその時点で完了していた揚げ即席麺を用いた性能評価のみとした。揚げ即席麺以外の食品を用いて、17年版の性能評価を行った。

1-5-1. 食品からの脂質抽出

30 mL容又は50 mL容遠沈管又は50 mL容ファルコンチューブに、予め均質 [3-1-2参照] にした食品試料 5±0.1 g、ポリアクリル酸 5 g、石英砂 15 gを採取し、スパテラでよく混合した。

※水分濃度の高い食品や米菓の場合は、縦長の容器内で念入りに混合しないと、溶媒留去後に水分が残存する可能性があるため注意すること [3-2-1参照]。

40 mL容のPLEセルに、遠沈管の中身をミクロスパテラやシリコン製のヘラを用いて移し替え、PLE装置にセットした。表1-2に示す条件で抽出を行った。

表1-2. PLEによる抽出条件

圧力 ^{a)}	50 bar（装置の最小値）
温度	40℃
予備加熱時間 ^{b)}	0分間（予備加熱は設定できず）
加熱時間	5分間
静置時間	5分間
窒素ガス置換	3分間
抽出サイクル	2
抽出溶媒	<i>tert</i> ブチルメチルエーテル 100%

a) 圧力は、EFSA法プロトコルでは15年版では周囲環境圧力、17年版では加圧なしまたは最低圧力、18年版では1500 psi（≒103 bar）とされている。

b) 予備加熱時間は、EFSA法プロトコルでは15年版では0分間、17年版では0分間、18年版では5分間とされているが、本研究に用いた装置では設定できなかった。

抽出後、溶媒捕集ビン中の溶媒を、予め重量を計量しておいた50 mL容遠沈管に移し替えた。EFSA法には記載がないが、空になった溶媒捕集ビンはtertブチルメチルエーテルで共洗いし、この溶媒も遠沈管に移し替えた。共洗いは3回行った。窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて、40℃条件下で窒素を吹き付けて遠沈管内の溶媒を留去した。抽出した溶媒量が多い場合には、溶媒を半分程度留去した後、再度溶媒捕集ビンの溶液を移し替えた。溶媒留去後の容器重量を計測した。食品中の脂質濃度は次の式1-1を用いて算出した。

※かりんとうのように、脂質が糖でコーティングされている食品は、脂質の抽出が不十分となる可能性があるため、当該食品の脂質濃度の測定に一般的に用いられる方法で測定した脂質濃度と、本法のPLEで抽出した脂質量から計算した食品中の脂質濃度を必ず比較すること [3-2-2参照]。

$$\text{食品中の脂質濃度 (\%)} = \left[(\text{溶媒留去後の抽出物重量} + \text{容器重量}) - (\text{容器重量}) \right] \div \text{食品採取量} \times 100 \cdots \text{式1-1}$$

1-5-2. 標準試料の調製

1-5-2-1. 揚げ即席麺の分析に用いる標準試料（15年版を参考にした）

ガラス製マイクロシリンジを用いて、標準混合溶液 I、II [1-4-3-1] を表 1-3 に従って、スクリューキャップ付 10 mL 容ガラス製褐色試験管に添加した。各褐色試験管にガラス製マイクロシリンジを用いて内標準混合溶液 [1-4-2] を 0.05 mL 添加した。以降の操作は [1-5-4. GE の臭素化・中和・抽出] から、揚げ即席麺と同様に行った。

表 1-3. 標準試料の調製

	標準混合溶液	添加量 (mL)
STD 1	II	0.02
STD 2		0.06
STD 3	I	0.02
STD 4		0.04
STD 5		0.06
STD 6		0.08
STD 7		0.10
STD 8		0.12
STD 9		0.15
STD10		0.20

1-5-2-2. 揚げ即席麺以外の食品の分析に用いる標準試料（17年版を参考にした）

遊離型分析種（3-MCPDE から変換された 3-MCPD、GE から変換された 3-MBPD）は、溶媒留去時に揮散する。特に、食品マトリクスが存在する食品試料よりも、存在しない標準

試料では揮散が顕著である。そのため、17年版からは、溶媒留去時の遊離型分析種の揮散を防ぐため、標準試料には3-MCPDE、GEを含有しないBlank油を添加するよう方法が改良された。本研究では、Blank油としてニップン アマニ油（日本製粉（株））を用いた。

スクリーキャップ付10 mL容ガラス製褐色試験管に、Blank油を各100 mg採取した。ガラス製マイクロシリンジを用いて、トルエン又はCal 1～Cal 5（表1-1）0.1 mLを各試験管に添加した（表1-4）。以降の操作は、[1-5-3. 固相抽出] から、揚げ即席麺以外の食品試料と同様に行った。

表 1-4. 標準試料の調製（Cal 1～Cal 5 は表 1-1 に記載）

	標準混合溶液	添加量 (mL)
STD 0	トルエン	0.1
STD 1	Cal 1	0.1
STD 2	Cal 2	0.1
STD 3	Cal 3	0.1
STD 4	Cal 4	0.1
STD 5	Cal 5	0.1

1-5-3. 固相抽出（17年版から追加）：揚げ即席麺以外の食品の場合

抽出した脂質 100 mgを1.5 mLバイアルに採取した。バイアルに、ガラス製マイクロシリンジを用いて、エステル型分析種の内標準混合溶液（3-MCPD-P/P-*d*₅ トルエン溶液及びG-O-*d*₅ トルエン溶液）[1-4-2（15年版を参考にし、調製した内標準混合溶液）] 0.05 mLを加えた。バイアルに、ヘキサン・酢酸エチル（85:15, v/v）混液 0.5 mLを加えてボルテックスで混合した。固相カラム [500 mg アミノプロピル(NH₂)] は予めヘキサン・酢酸エチル（85:15, v/v）混液 2 mLでコンディショニングした。コンディショニング後の固相カラムを10 mL容スクリーキャップ付褐色試験管の上に移して試料を負荷した。さらに、ヘキサン・酢酸エチル（85:15, v/v）混液 10 mLを負荷した。自然落下方式で、固相カラムから溶出された溶媒を全て採取した。

※EFSA法に記載はないが、固相カラム内に残った洗浄液の押し出しは行わなかった。

窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて、40℃条件下で窒素ガスを吹き付け、溶媒を留去した。

1-5-4. GEの臭素化・中和・抽出

EFSA法15年版では、抽出した脂質 100 mgを10 mL容褐色試験管に採取した。ガラス製マイクロシリンジを用いてエステル型分析種の内標準（3-MCPD-P/P-*d*₅及びG-O-*d*₅）混合溶液 [1-4-2] を0.05 mLを加えた。17年版及び標準試料ではこの操作は省いた。

テトラヒドロフラン（無水）を2 mL加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌して残渣を溶解した。酸性の臭化ナトリウム溶液 [調製試薬1-3-1] を30 µL加え、ボルテックスミキサーで

15秒間撹拌した。50℃、15分間加温し、GEを3-ブロモ-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル（3-MBPDE）へと臭素化した。次いで、臭素化反応を停止するために、0.6%（w/v）炭酸水素ナトリウム水溶液〔調製試薬1-3-2〕を3 mL加えた。試験管にヘキサンを2 mL加え、ボルテックスミキサーで15秒間撹拌後、有機層をパスツールピペットで新たな10 mL容スクリーキャップ付褐色試験管に移した。窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて、40℃条件下で窒素ガスを吹き付けて試験管中の有機層を留去した。

1-5-5. メタノリシス（酸条件下のエステル交換反応）

試験管の残渣にテトラヒドロフランを1 mL加えて溶解し、1.8%（v/v）硫酸・メタノール溶液〔調製試薬1-3-3〕を1.8 mL加えた後、試験管のキャップを固く閉め、ボルテックスミキサーで15秒間撹拌した。エステル型分析種を遊離型分析種へと分解するため、静置で40℃、16時間加温した。

1-5-6. 中和・溶媒留去

16時間経過後、反応を止めるため、試験管に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液〔調製試薬1-3-4〕を0.5 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間撹拌した。有機溶媒を除去するため、液量が約1 mLになるまで40℃条件下で窒素ガスを吹き付けた。

※ヤシ油、乳脂等の中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合、有機溶媒が残存すると、中鎖脂肪酸メチルをヘキサン洗浄で除去できず、クロマトグラム上に中鎖脂肪酸メチルが妨害ピークとして検出される。試験管内の液量が0.5～0.8 mLになるまで溶媒を留去すること〔3-2-3参照〕。

1-5-7. ヘキサン洗浄・酢酸エチル抽出

溶媒留去後の試験管に、40%（w/v）硫酸アンモニウム水溶液〔調製試薬1-3-5〕1.3 mL、ヘキサン 1 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間撹拌し、パスツールピペットで有機層を除去した。再度ヘキサンを1 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間撹拌し、有機層を除去した。酢酸エチル0.6 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間撹拌し、少量の硫酸ナトリウムを含む新たな試験管に有機層を採取した。酢酸エチルによる抽出は3回繰り返した。

1-5-8. 誘導體化・溶媒留去

有機層を移した試験管に、フェニルボロン酸溶液〔調製試薬1-3-6〕を0.15 mL加え、ボルテックスミキサーで混合した。超音波洗浄装置内で室温、5分間反応させた。窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて、40℃条件下で窒素を吹き付け、溶媒を留去した。残渣にイソオクタンを0.3 mL加えて溶解した。3,500 rpmで数10秒間遠心（フラッシュ）後、上清を微量インサート入りGCバイアルに移し、GC-MS検液とした。

1-6. GC-MS

1-6-1. ガスクロマトグラフ

GC カラム： VF-5ms
(長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、ガードカラム 5 m)
キャリアーガス： ヘリウム, 1.2 mL/分で一定流量
注入量： 1.0 μ L
注入法： スプリットレス
注入口温度： 250 $^{\circ}$ C
カラムオーブン： 60 $^{\circ}$ C : 1 分保持、60 $\sim$ 150 $^{\circ}$ C : 6 $^{\circ}$ C/分、150 $^{\circ}$ C : 2 分保持、150 $\sim$ 300 $^{\circ}$ C : 10 $^{\circ}$ C/分 (計 33 分)

1-6-2. 質量分析計

イオン化法： 電子イオン化
GC-MS 接続部温度： 300 $^{\circ}$ C
イオン源温度： 230 $^{\circ}$ C (15 年版、揚げ即席麺)
250 $^{\circ}$ C (17 年版、揚げ即席麺以外の食品)
データ採取時間： 5 $\sim$ 20 分
選択イオン： 各標準物質の定量イオン、定性イオンは表 1-5 に示す。
どちらのイオンを定量に用いてもよい。

表 1-5. EFSA 法の定量イオン、定性イオン

	定量イオン	定性イオン
3-MCPD- <i>d</i> ₅ PBA 誘導体	<i>m/z</i> 150	<i>m/z</i> 201
3-MCPD PBA 誘導体	<i>m/z</i> 147	<i>m/z</i> 196
3-MBPD- <i>d</i> ₅ PBA 誘導体	<i>m/z</i> 150	<i>m/z</i> 245
3-MBPD PBA 誘導体	<i>m/z</i> 146	<i>m/z</i> 240

※本研究では標準・食品試料ともに、*m/z* 146 の 3-MBPD-PBA の保持時間と重なる妨害ピークが検出されたため、*m/z* 240 を定量イオンとして使用した (図 1-1)。
3-MBPD-PBA については、AOCS Cd29a⁶⁾では定量イオン *m/z* 147、定性イオン *m/z* 240、EFSA 法 17 年版では定量イオン *m/z* 146、定性イオン *m/z* 240、EFSA 法 18 年版³⁾では定量イオン *m/z* 242、定性イオン *m/z* 147 と毎回修正されている。
また、3-MBPD-*d*₅ PBA 誘導体についても、AOCS Cd-29a 及び EFSA 法 17 年版では定量イオン *m/z* 150、定性イオン *m/z* 245 であるのに対し、EFSA 法 18 年版では定量イオン *m/z* 245、定性イオン *m/z* 150 と修正されている。
EFSA 法にも、定量イオンと定性イオンのどちらを選択イオンとして使用してもよい旨記載があるため、分析前に予め、3-MBPD を *m/z* 146、147、240、245 でモニタリングし、3-MBPD の保持時間と重なる夾雑物が検出されず、かつ、安定した感度の得られるイオンを、分析を行う機関毎に選定する方が良いでしょう。

1-7. 定量

1-7-1. 検量線の作成

内標準（3-MCPD-*d*₅又は3-MBPD-*d*₅）の誘導体化物のピーク面積に対する、標準（3-MCPD又は3-MBPD）の誘導体化物のピーク面積の比を *Y* 軸に、内標準の誘導体化物の絶対量に対する標準の誘導体化物の絶対量を *X* 軸にプロットし、 $Y=aX+b$ （*a*：傾き、*b*：切片）の内標準検量線を得た。各誘導体化物の絶対量は、

エステル型分析種の絶対量 ×（遊離型分析種の分子量/エステル型分析種の分子量）
から算出した。

1-7-2. 試料中の3-MCPDE濃度及びGE濃度の算出

間接分析法は、試料中のエステル型分析種（3-MCPDE及びGE）を、遊離型分析種（3-MCPD及びグリシドール）当量として定量する手法である。EFSA法の分析値は『PLEにより抽出した脂質』中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）、GE濃度（グリシドール当量）である。

式1-2からPLEにより抽出した脂質中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）、式1-3及び式1-4からGE濃度（グリシドール当量）を算出した。

$$O_{3\text{-MCPD}} = [(A_{147}/A_{150}) \cdot b] \times IS \times 1/a \times 1/W \quad \dots \text{式1-2}$$

ただし、

$O_{3\text{-MCPD}}$ ： 抽出した脂質中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）（mg/kg）

A_{147} ： 3-MCPD PBA誘導体（*m/z* 147）のピーク面積

A_{150} ： 3-MCPD-*d*₅ PBA誘導体（*m/z* 150）のピーク面積

IS ： 試料に添加した3-MCPD-P/P-*d*₅の3-MCPD-*d*₅当量（μg）

W ： 抽出した脂質の採取量（g）

$$O_{3\text{-MBPD}} = [(A_{240}/A_{150}) \cdot b] \times IS \times 1/a \times 1/W \quad \dots \text{式1-3}$$

ただし、

$O_{3\text{-MBPD}}$ ： 抽出した脂質中のGEを臭素化して得られた3-MBPDE濃度（3-MBPD当量）（mg/kg）

A_{240} ： 3-MBPD PBA誘導体（*m/z* 240）のピーク面積

A_{150} ： 3-MBPD-*d*₅ PBA誘導体（*m/z* 150）のピーク面積

IS ： 試料に添加したG-P-*d*₅の3-MBPD-*d*₅当量（μg）

W ： 抽出した脂質の採取量（g）

$$O_{\text{Glycidol}} = O_{3\text{-MBPD}} \times (M_{\text{Glycidol}}/M_{3\text{-MBPD}}) \quad \dots \text{式1-4}$$

ただし、

O_{Glycidol} ： 抽出した脂質中のGE濃度（グリシドール当量）（mg/kg）

M_{Glycidol} ： グリシドールの分子量 74.08

$M_{3\text{-MBPD}}$ ： 3-MBPDの分子量 154.99

EFSA法の分析値は、抽出した脂質中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）、GE濃度（グリシドール当量）であるため、脂質抽出後に算出した食品の脂質濃度（式1-1から算出）を用いて、食品試料中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）、GE濃度（グリシドール当量）を算出する。

$$C = O \times E / 100$$

・・・式1-5

ただし、

C : 食品試料中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）又はGE濃度（グリシドール当量）（mg/kg）

O : 抽出した脂質中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）又はGE濃度（グリシドール当量）（mg/kg）

E : 食品の脂質濃度（%）。式1-1から算出。

1-8. GC-MS クロマトグラム

EFSA法 17年版の標準試料 STD 3 [1-5-2-2]のGC-MSクロマトグラムを図1-1に示す。

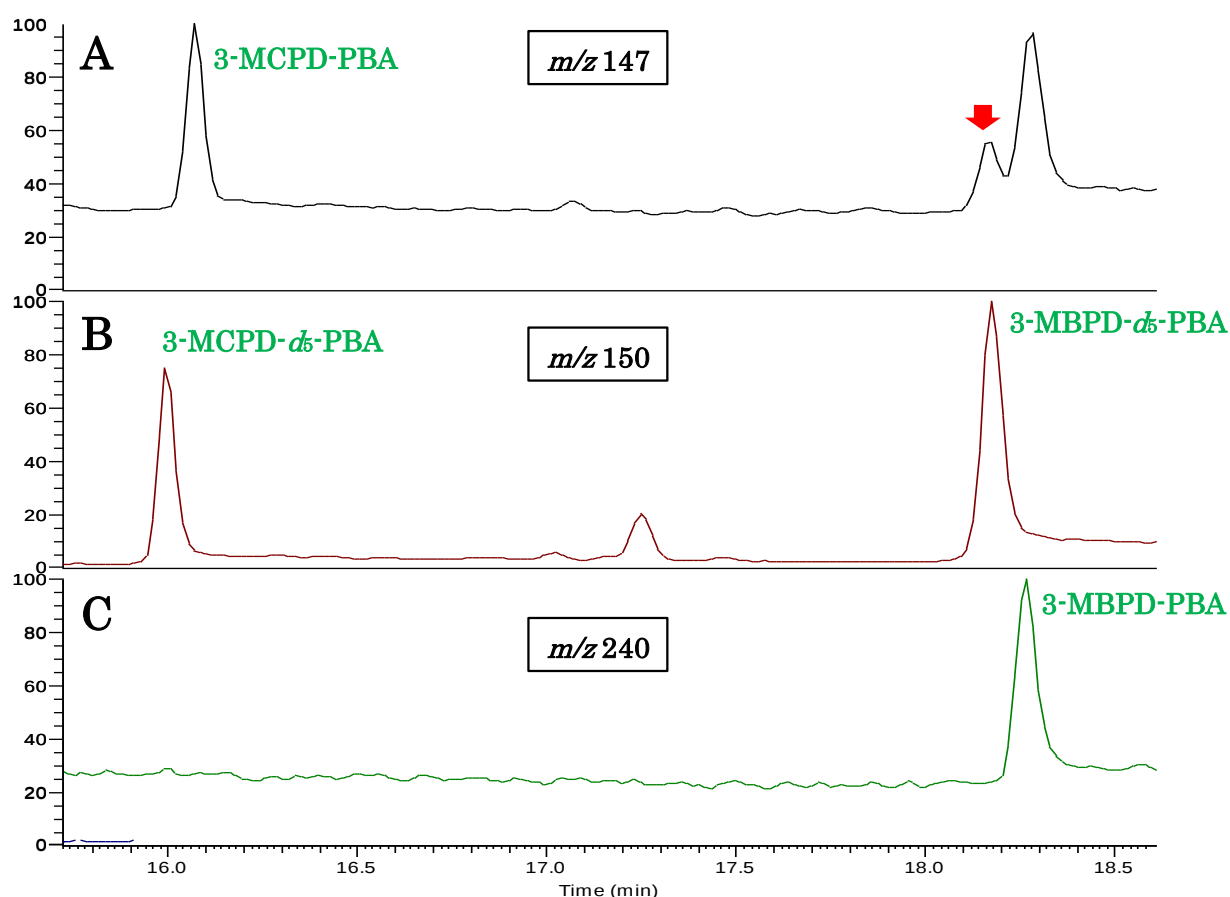


図1-1. EFSA法 17年版の標準試料 STD 3の各PBA誘導体化物のGC-MSクロマトグラム

A : 3-MCPD-PBA (m/z 147)、B : 3-MCPD- d_5 -PBA及び3-MBPD- d_5 -PBA (m/z 150)

C : 3-MBPD-PBA (m/z 240)。

Aの赤↓は3-MBPD-PBAのピークと重なる妨害ピーク。 m/z 146にも検出された。酵素法では検出されなかったことから、EFSA法の抽出・精製工程に由来すると考える。

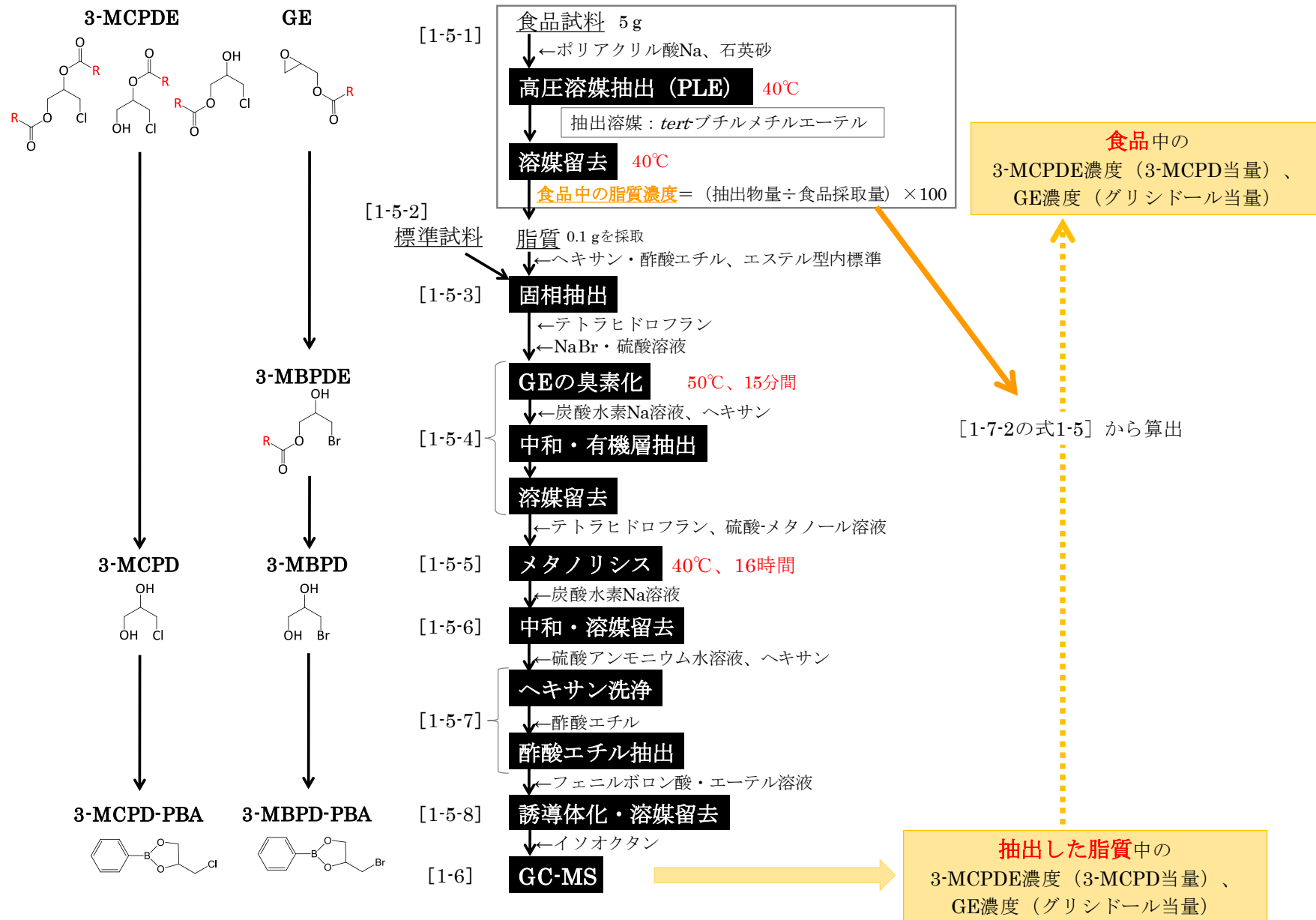


図1-2. EFSA法 17年版の概略図

2 章. 確立した分析法 (酵素法⁴⁵⁾ の改良)

酵素法は、食品試料中の 3-MCPDE 及び GE を液液抽出により、脂質とともに抽出する。抽出した脂質中の 3-MCPDE をリパーゼ加水分解により 3-MCPD へ、GE を加水分解及び臭素化により 3-MBPD へと変換後、誘導体化して GC-MS にて分析し、食品試料中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を、それぞれ遊離型の 3-MCPD 当量、グリシドール当量として定量する。

油脂中の 3-MCPDE、GE を分析するための酵素法は、日本油化学会の基準油脂分析試験法として登録されている。油脂を含む食品を分析するため、[2-5-1. 食品からの 3-MCPDE、GE の抽出] の操作を追加した。それ以外に変更・追加した操作の記述には下線を引いた。

2-1. 器具及び装置

2-1-1. メスフラスコ (5 mL 容、10 mL 容)

2-1-2. ホールピペット又はガラス製マイクロシリンジ

2-1-3. マイクロピペット

2-1-4. ガラス製パストールピペット

2-1-5. スクリューキャップ付試験管 (10 mL 容)

2-1-6. 恒温水槽

2-1-7. ボルテックスミキサー

2-1-8. 遠心分離機

2-1-9. 高速振とう機。本研究では、水平偏芯振動振とう型の CM-1000 (EYELA 東京理化工械) を使用した。

2-1-10. 窒素吹付けユニット付ドライサーモユニット (タイテック)

2-1-11. PTFE メンブランフィルター。孔径 0.2 μm 、直径 4 mm。(トムシック)

2-1-12. 1 mL シリンジ

2-1-13. pH メーター (堀場製作所)

2-1-14. GC-MS

1-1-14-1. ガスクロマトグラフ : TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific)

1-1-14-2. 質量分析計 : TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific)

2-1-15. GC カラム : VF-5ms、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm (Agilent Technologies)

2-2. 試薬

2-2-1. 臭化ナトリウム、特級 (和光純薬工業)

2-2-2. クエン酸、特級 (関東化学)

2-2-3. リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 (和光純薬工業)

2-2-4. *tert*-ブチルメチルエーテル、残留農薬用又は高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業)

※本研究では上記グレードを使用したが高級でもよい

2-2-5. リパーゼ : *Candida cylindracea*、又は *Candida rugosa* 由来のもの

本研究では、リパーゼ AYS アマノ (和光純薬工業) を使用した。

2-2-6. フェニルボロン酸 (PBA)、純度 $\geq 97\%$ (東京化成工業)

- 2-2-7. エタノール、特級（和光純薬工業）
- 2-2-8. 2,2,4-トリメチルペンタン（イソオクタン）、特級（和光純薬工業）
- 2-2-9. ヘキサン、特級（和光純薬工業）
- 2-2-10. 硫酸ナトリウム、特級（和光純薬工業）
- 2-2-11. アセトン、特級（和光純薬工業）
- 2-2-12. 標準、内標準試薬
 - 2-2-12-1. 3-MCPD（和光純薬工業）
 - 2-2-12-2. 3-MBPD（和光純薬工業）
 - 2-2-12-3. 3-MCPD の重水素標識体 (3-MCPD- d_5) (CDN Isotope)
 - 2-2-12-4. 3-MBPD の重水素標識体 (3-MBPD- d_5) (Toronto Research Chemicals, 和光純薬工業)
- 2-2-13. ヘリウムガス（純度 99.999%）：GC-MS 用

2-3. 調製試薬

2-3-1. 30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液：臭化ナトリウム 30 g を超純水 80 mL に溶解した。1 mM クエン酸水溶液及び 1 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液を加えて pH を 5.0～5.5 になるよう調整した。超純水を加えて 100 mL まで定容した。

2-3-2. リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液：試料数 10 を分析する場合、*C. cylindracea* (*C. rugosa*) 由来リパーゼ 3,600 U を 30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液〔調製試薬 2-3-1〕40 mL に溶解し、90 U/mL リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液を調製した。短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料や原材料不明の試料の場合は、2 倍の 180 U/mL リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液を用いること。

※短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂（例．乳脂、ヤシ油）を含む試料の場合、リパーゼによる加水分解速度が抑制されるため、リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液の濃度は 2 倍の 180 U/mL とすること。ただし、酵素量の増加による分析への影響はないため、短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂を含まない試料の場合でも、180 U/mL リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液を用いても問題ない [3-3-1 参照]。

2-3-3. フェニルボロン酸（PBA）溶液：PBA 0.25 g を超純水／アセトン（1:19, v/v）混液 10 mL に溶解した。

2-4. 標準・内標準試薬の調製

分析種間の変換を防ぐため、混合せず、単一成分のストック溶液とした。本研究の期間、-20℃で 6 か月間保存した。

2-4-1. 標準ストック溶液

2-4-1-1. 300 µg/mL 3-MCPD エタノール溶液：3-MCPD 標準試薬 3.0 mg を 10 mL 容メスフラスコに採取し、エタノールで定容した。

2-4-1-2. 300 µg/mL 3-MBPD エタノール溶液：3-MBPD 標準試薬 3.0 mg を 10 mL 容メスフラスコに採取し、エタノールで定容した。

2-4-2. 内標準ストック溶液

2-4-2-1. 200 µg/mL 3-MCPD-*d*₅ エタノール溶液：3-MCPD-*d*₅ 標準試薬 1.0 mg を 5 mL 容メスフラスコに採取し、エタノールで定容した。

2-4-2-2. 200 µg/mL 3-MBPD-*d*₅ エタノール溶液：3-MBPD-*d*₅ 標準試薬 1.0 mg を 5 mL 容メスフラスコに採取し、エタノールで定容した。

2-4-3. 標準（3-MCPD 及び 3-MBPD）混合溶液の調製

下記の標準混合溶液を調製した。

標準混合溶液Ⅰ：ガラス製マイクロシリンジ又はホールピペットを用いて、3-MCPD ストック溶液 [2-4-1-1]、3-MBPD ストック溶液 [2-4-1-2] を 0.5 mL ずつ 10 mL 容メスフラスコに採取した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 [調製試薬 2-3-1] で定容した。

標準混合溶液Ⅱ：ガラス製マイクロシリンジ又はホールピペットを用いて、標準混合溶液Ⅰ 1 mL を 10 mL 容メスフラスコに採取した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 [調製試薬 2-3-1] で定容した。

2-4-4. 内標準（3-MCPD-*d*₅ 及び 3-MBPD-*d*₅）混合溶液の調製

ガラス製マイクロシリンジ又はホールピペットを用いて、3-MCPD-*d*₅ ストック溶液 [2-4-2-1]、3-MBPD-*d*₅ ストック溶液 [2-4-2-2] を 0.1 mL ずつ 10 mL 容メスフラスコに採取した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 [調製試薬 2-3-1] で定容した。

2-5. 試料調製

揚げ油等の油脂試料は、0.10～0.11 g となるように試験管に採取後、[2-5-2] 以降の操作を行った。食品試料では [2-5-1] の操作を追加した。

2-5-1. 食品からの3-MCPDE、GEの抽出

食品中の脂質量が約 0.10～0.11 g となるように、予め均質にした [3-1-2 参照] 食品試料を、

【0.10÷食品の脂質濃度 (%)】～【0.11÷食品の脂質濃度 (%)】

の範囲内で 10 mL 容スクリーキャップ付ガラス試験管に採取した。

※食品の脂質濃度が不明の場合には、[2-8. 食品中の脂質濃度の推定] に従い、おおよその脂質濃度を算出すること。

試験管に *tert*-ブチルメチルエーテル・イソオクタン (2:1, v/v) 混液 3 mL、エタノール 1 mL を加えて、キャップを閉めた。ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、60℃、5 分間加温した。加温後すぐに（試験管が温かいうちに）、高速振とう機で 10 分間攪拌した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 [調製試薬 2-3-1] を 4 mL 加えてキャップを閉めた。ボルテックスミキサーで 10 秒

間攪拌後、3,500 rpm で 5 分間遠心した。有機層を新たな試験管に採取した。水層を含む試験管に、*tert*-ブチルメチルエーテル・イソオクタン（2:1, v/v）混液 3 mL を再度加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、3,500 rpm で 5～10 分間遠心した。有機層を新たな 10 mL 容スクリーキャップ付試験管に採取し、窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて 40℃条件下で窒素を吹き付け、溶媒を留去した。

※有機溶媒の残存は加水分解を妨害するため、完全に留去すること。水分は加水分解に影響しないため、水分の混入は問題ない。

2-5-2. 加水分解

油脂試料を分析する場合は、10 mL容スクリーキャップ付試験管に試料を100～110 mg採取した。食品試料では、この操作は省いた。油脂試料または〔2-5-1〕の残渣（食品試料の場合）にイソオクタン0.5 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌して溶解した。室温で固体の油脂試料の場合は、イソオクタンを加えた後に60℃に調節した恒温水槽で加温した後、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌して油脂を溶解した。*Candida cylindracea*由来リパーゼ含有30%NaBr水溶液〔調製試薬2-3-2〕3 mLを加えて蓋を閉め、室温、30分間、高速振とう機（水平偏芯振動振とう機の場合は振とう速度 1,800 rpmとする）を用いて振とうした。

※縦往復振とう機の場合は、速度200 rpm、振幅約4 cm、水平往復振とう機の場合は、試験管を水平から60° の傾きに置き、速度250～400 rpm、振幅2～3 cmとする。

2-5-3. グリシドールの臭素化

加水分解後の試験管を、遠心分離機で10秒間遠心分離した。試験管を80℃に調節した恒温水層で10分間加温し、グリシドールのエポキシ環を開環、臭素化して3-MBPDへと変換した。その後、試験管を室温になるまで放冷、または水冷した。

2-5-4. ヘキサン洗浄

マイクロピペットを用いて内標準混合溶液〔2-4-4〕0.05 mLを試験管に加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。

※中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料の場合は、水層に溶解する中鎖脂肪酸を除去するため、ヘキサン洗浄の前にジエチルエーテル洗浄を1回追加すること。試験管にジエチルエーテル 3 mLを加え、キャップを閉めた。ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、10秒間遠心分離し、有機層を除去した〔3-3-1参照〕。

ヘキサン3 mLを加えてキャップを閉めた。ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、10秒間遠心分離した。パスツールピペットで水層を新たな試験管に移した。水層を移した試験管にヘキサン3 mLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した。有機層をパスツールピペットで除去した。

2-5-5. 誘導体化・抽出

試験管に、PBA溶液〔調製試薬2-3-3〕を0.1 mL、ヘキサンを3 mL加えて蓋を閉めた。試験管を高速振とう機で10分間振とうし、遊離型分析種及び重水素標識された遊離型分析種を誘導体化した。

遠心分離機で3,000 rpm、1～5分間遠心分離後、少量の硫酸ナトリウムを含む新たな試験管に有機層をパスツールピペットで移した。窒素吹付けユニット付ドライサーモユニットを用いて40℃条件下で窒素ガスを吹き付け、溶液が0.5～0.8 mLになるまで濃縮した。溶液を完全に留去してしまった場合は、試験管にヘキサン0.3 mLを追加した。ボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、溶液をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を微量インサート入りGCバイアルに移してGC-MS検液とした。

2-5-6. 標準試料の調製

標準混合溶液 I、II [2-4-3] を表 2-1 に従って、スクリューキャップ付 10 mL 容褐色試験管に添加した。各試験管に 30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 [調製試薬 2-3-1] 3 mL 及び内標準混合溶液 [2-4-4] 0.05 mL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。以降の操作は [2-5-5. 誘導体化・抽出] から食品試料と同様に行った。

表 2-1. 標準試料の調製

	標準混合溶液	添加量 (mL)
STD 0	-	0
STD 1	II	0.005
STD 2		0.02
STD 3		0.05
STD 4		0.10
STD 5	I	0.02
STD 6		0.035
STD 7		0.05
STD 8		0.08

2-6. GC-MS

2-6-1. ガスクロマトグラフ

GC カラム： VF-5ms
(長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm、ガードカラム 5 m)

キャリアーガス： ヘリウム, 1.2 mL/ 分で一定流量

注入量： 1.5 μL

注入法： スプリットレス

注入口温度： 250℃

カラムオーブン： 60℃:1 分保持、60～150℃:10℃/ 分、150～180℃:3℃/ 分、180～300℃:30℃/分、300℃:8 分保持 (計 32 分)

2-6-2. 質量分析計

イオン化法： 電子イオン化

GC-MS 接続部温度：280℃

イオン源温度： 230℃

データ採取時間： 10～20 分

選択イオン： 各標準物質の定量イオン、定性イオンを表 2-2 に示す。

表 2-2. 酵素法の定量イオン、定性イオン

	定量イオン	定性イオン
3-MCPD- <i>d</i> ₅ PBA 誘導体	<i>m/z</i> 150	<i>m/z</i> 201
3-MCPD PBA 誘導体	<i>m/z</i> 147	<i>m/z</i> 196
3-MBPD- <i>d</i> ₅ PBA 誘導体	<i>m/z</i> 150	<i>m/z</i> 245
3-MBPD PBA 誘導体	<i>m/z</i> 147	<i>m/z</i> 240

2-7. 定量

2-7-1. 検量線の作成

内標準（3-MCPD-*d*₅又は3-MBPD-*d*₅）の誘導体化物のピーク面積に対する、標準（3-MCPD又は3-MBPD）の誘導体化物のピーク面積の比を *Y* 軸に、内標準の誘導体化物の絶対量に対する標準の誘導体化物の絶対量を *X* 軸にプロットし、 $Y=aX+b$ （*a*：傾き、*b*：切片）の内標準検量線を得た。

2-7-2. 試料中の3-MCPD濃度、グリシドール濃度の算出

間接分析法は、試料中のエステル型分析種（3-MCPDE及びGE）を遊離型分析種（3-MCPD及びグリシドール）当量で定量する手法である。酵素法の分析値は食品中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）、GE濃度（グリシドール当量）である。

式2-1から食品中の3-MCPDE濃度、式2-2及び式2-3からGE濃度を算出した。

$$C_{3\text{-MCPD}} = [(A_{147}/A_{150}) - b] \times IS \times 1/a \times 1/W \quad \dots \text{式2-1}$$

ただし、

$C_{3\text{-MCPD}}$ ： 食品中の3-MCPDE濃度（3-MCPD当量）（mg/kg）

A_{147} ： 3-MCPD PBA誘導体（*m/z* 147）のピーク面積

A_{150} ： 3-MCPD-*d*₅ PBA誘導体（*m/z* 150）のピーク面積

IS ： 食品試料に添加した3-MCPD-*d*₅量（μg）

W ： 食品試料の採取量（g）

$$C_{3\text{-MBPD}} = [(A_{240}/A_{150}) - b] \times IS \times 1/a \times 1/W \quad \dots \text{式2-2}$$

ただし、

$C_{3\text{-MBPD}}$: 食品中のGEを加水分解・臭素化して得られた3-MBPD濃度 (mg/kg)
 A_{147} : 3-MBPD PBA誘導体 (m/z 147) のピーク面積
 A_{150} : 3-MBPD- d_8 PBA誘導体 (m/z 150) のピーク面積
 IS : 食品試料に添加した3-MBPD- d_8 量 (μg)
 W : 食品試料の採取量 (g)

$$C_{\text{Glycidol}} = C_{3\text{-MBPD}} \times (M_{\text{Glycidol}} / M_{3\text{-MBPD}}) \quad \dots \text{式2-3}$$

ただし、

C_{Glycidol} : 食品中のGE濃度 (グリシドール当量) (mg/kg)
 M_{Glycidol} : グリシドールの分子量 74.08
 $M_{3\text{-MBPD}}$: 3-MBPDの分子量 154.99

2-8. 食品中の脂質濃度の推定 [3-3-2 参照]

食品中の脂質濃度が不明である場合、食品試料の採取量を決めるために、初めに脂質濃度の推定を行った。食品試料 0.3~0.5 g を 10 mL 容スクリュウキャップ付ガラス試験管に採取した。*tert*-ブチルメチルエーテル・イソオクタン (2:1, v/v) 混液 をホールピペットで正確に 3 mL 加えた。さらに、エタノール 1 mL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、60℃、5 分間加温した。加温後すぐに高速振とう機で 10 分間攪拌した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液[調製試薬 2-3-1] 4 mL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、3,500 rpm で 5 分間遠心した。上層 (有機層) 2 mL をホールピペットで採取し、予め重量を計量しておいた 10 mL 容試験管に移した。この時、水層を吸い込まないよう、有機層の上部分にホールピペットの先端を差し込み、ゆっくりと有機層を吸い上げること。40℃条件下で窒素を吹き付けて溶媒を完全に留去し、容器重量を計測した。食品中の脂質濃度は下式を用いて算出した。

食品中の脂質濃度 (% , w/w)

$$= [(\text{溶媒留去後の抽出物重量} + \text{容器重量}) - (\text{容器重量})] \div \text{食品採取量} \times 3 \div 2 \times 100 \quad \dots \text{式2-4}$$

2-9. GC-MS クロマトグラム

酵素法による標準試料 STD 5 [2-5-6]の GC-MS クロマトグラムを図 2-1 に示す。

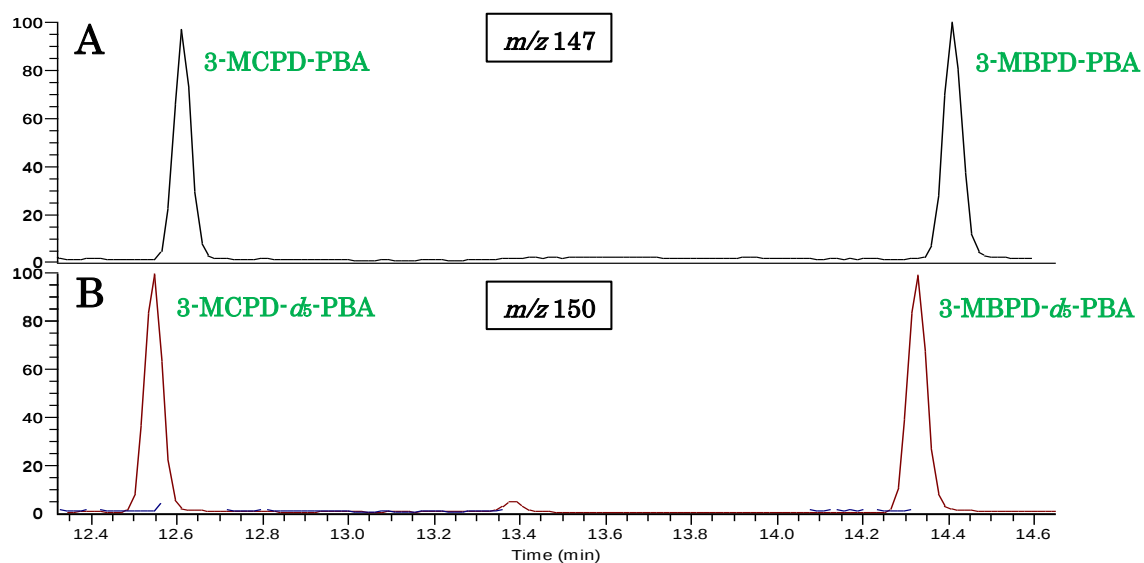


図2-1. 酵素法の標準試料 STD 5の各PBA誘導体化物のGC-MSクロマトグラム

A : 3-MCPD-PBA、及び3-MBPD-PBA (m/z 147)

B : 3-MCPD- d_5 -PBA、及び3-MBPD- d_5 -PBA (m/z 150)

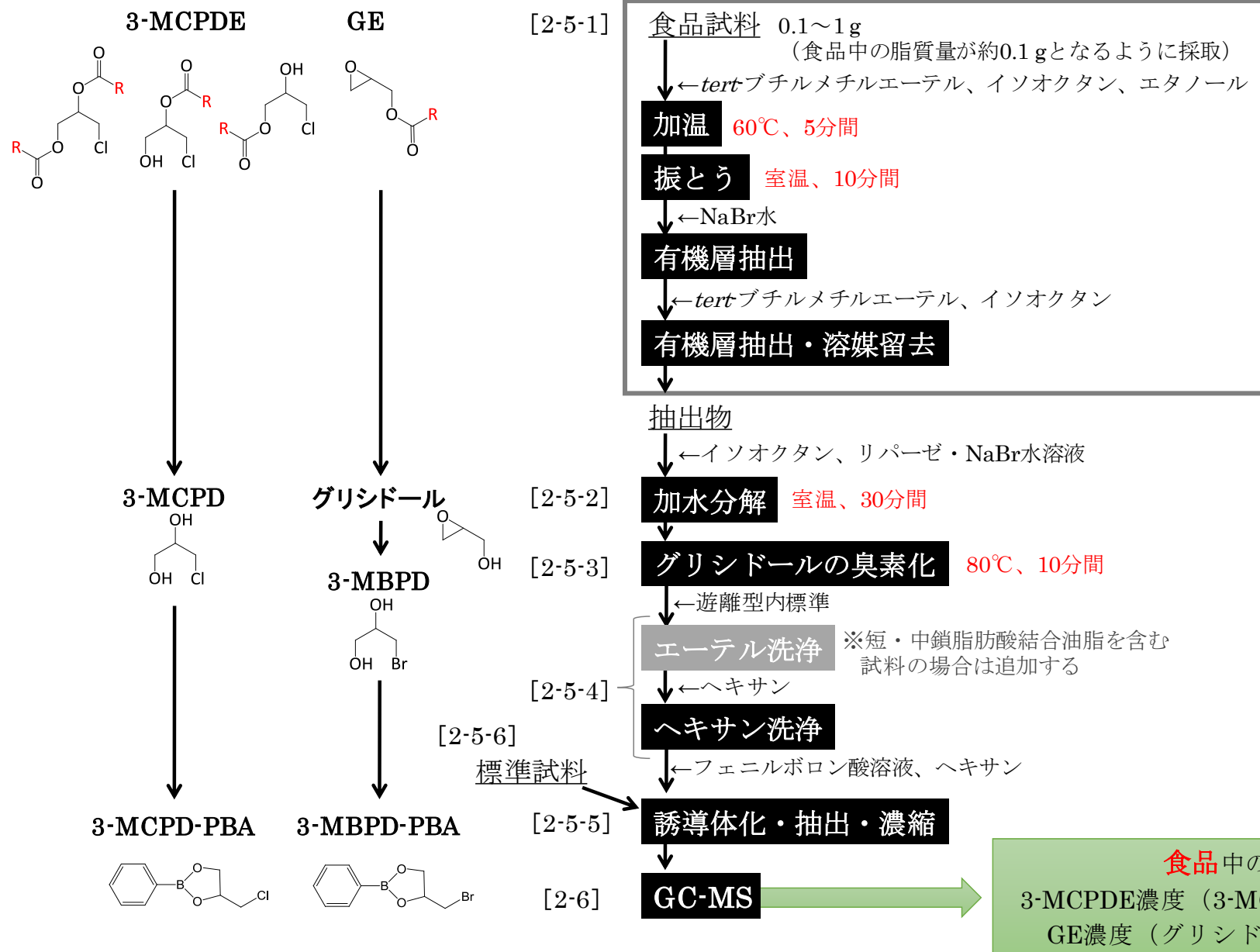


図2-2. 酵素法の概略図

3 章. 中課題 1：加熱調理された食品中の 3-MCPDE、GE 分析法の確立

3-1. 性能評価の方法

3-1-1. 対象食品の選定

性能評価に用いる食品の選定基準は下記の①～③とした。

基準①：「国内又は海外で 3-MCPDE、GE の含有実態が報告されていない食品」かつ「日本人の消費量が多いと考えられる食品」。

また、海外で含有実態が報告されている食品でも、海外と日本で、原料の油種、加熱程度が異なる場合には本研究の対象とした。

基準②：「3-MCPDE 濃度、GE 濃度の高い食用植物油脂を原料、又は揚げ油とする食品」。

平成 24、25 年度の農林水産省の含有実態調査の結果¹⁰⁾より、選定する際の優先度が高い油種はパーム油、米油、コーン油とした。

基準③：「加熱調理の手法として、焼いた又は揚げた食品」。

3-MCPDE、GE は高温の脱臭工程で生じることから、加熱温度が高い食品を選定した。

基準②の「3-MCPDE 濃度、GE 濃度の高い食用植物油脂を原料、又は揚げ油とする食品」と基準③の「加熱調理の手法として、焼いた又は揚げた食品」から食品を絞り込んだ後、基準①の「国内又は海外で 3-MCPDE、GE の含有実態が報告されていない食品」かつ「日本人の消費量が多いと考えられる食品」の観点で優先度を決定した（表 3-1）。

表 3-1. 性能評価に用いる食品の優先度

優先度	食品名	主要なマトリクス	基準② (油種)	基準③ ^{a)} (加熱温度、 加熱方法)	基準①	
					家族世帯 TI 値 ^{b)}	市場規模 ^{c)} (百万円)
1	揚げせんべい	米	米、パーム	200-250℃、揚げ	27.7	142,700
2	鶏から揚げ（冷凍食品）	鶏肉、衣	多種	170-180℃、揚げ	17.0	-
3	揚げ即席麺	小麦	パーム	140-150℃、揚げ	13.7	108,850
4	ビスケット	小麦	ショートニング等	200℃前後、焼き	7.1	157,900
5	かりんとう	小麦、糖	米、パーム等	200℃付近、揚げ	1.8	17,600
6	天ぷら	小麦、野菜、 又は魚	多種	160-170℃、揚げ 170-180℃、揚げ	7.5	-
7	揚げパン又はドーナツ	小麦、フィリング	パーム	不明、揚げ	6.1	-

^{a)} 揚げ温度は、日本油化学協会編 油脂化学便覧 改定三版 p508 図 8・13 を参考にした

^{b)} 食 MAP（ライフスケープマーケティング）における 1000 食卓機会あたりの頻度

^{c)} 富士経済 2017 年食品マーケティング便覧

本研究では、研究期間を考慮し、表 3-1 の上段の**計 5 食品**（揚げせんべい、鶏から揚げ、揚げ即席麺、ビスケット、かりんとう）を用いて分析法の性能評価を実施することとした。ただし、PLE によるかりんとうからの脂質抽出が不良であったため、次点の試料候補であった天ぷらでも性能評価を実施した [3-2-2 参照]。

各食品について、表 3-2 の要件を満たす製品を選定した。

表 3-2. 製品の選定要件

対象食品	要件
揚げせんべい	水に浸漬したうるち米を製粉し、蒸しながら練った餅状の生地を板状に伸ばして型抜きして乾燥し、植物油で揚げ、食塩等をまぶしたもの。塩味又は醤油味で、海苔などを含まないシンプルな製品とする。
鶏から揚げ	鶏肉に、小麦粉、片栗粉又は米粉などを薄くまぶして植物油（パーム油を含む）で揚げたもの。
揚げ即席麺	小麦粉を主原料とし、これに食塩、麺の弾力性、粘性を高める原料を加えて製麺し、植物油で揚げ、乾燥したもの。
ビスケット	小麦粉、砂糖、植物油脂及び食塩等 ^{※1} の原料を混合して練った生地を折りたたみ、シート状に圧延し、型抜きをして焼いたもの ^{※2} 。 ^{※1} ：ショートニングを含み、卵を含まないものとする。 ^{※2} ：ビスケットの表示に関する公正競争規約に基づく同規約の施行規則におけるクッキー（手作り風で、糖分、脂肪分の合計が重量百分比で 40%以上のもの）は除く。
かりんとう	小麦粉を主原料として、水、酵母等を加えて練った生地を棒状に成形し、植物油で揚げ、蜜掛けして [※] 、乾燥させたもの又はこれに風味原料を加えたもの。 [※] ：黒糖かりんとうが、かりんとう全体の 7 割の販売シェアを占めることから、黒糖を原料に含むものとする。
天ぷら	魚介又は野菜に、衣（小麦粉（薄力粉）、卵、水）をつけて、植物油で揚げたもの。

3-1-2. 食品試料の均質化と小分け

性能評価に用いる食品試料は、製品のロット等の違いによる 3-MCPDE 濃度、GE 濃度のばらつきを考慮するため、事前に数 kg 単位でフードプロセッサー DLC-10PRP（クイジナート）、ワーリングボトルブレンダー 7011HBC 型（大阪ケミカル）を用いて粉碎した。食品に過度に熱がかかることを防止するため、30 秒間粉碎、10～30 秒間停止を、外観が均質になるまで繰り返した。均質になった後、試料の凍結再融解を防ぐため、分析 1 回に使用する十分量である 80～100 g ずつアルミパウチに小分けし、保存した。賞味期限内に性能評価が完了する場合にはその食品の保存温度で保存し、賞味期限外になる場合には冷凍で保存した。性能評価に用いた食品試料（製品）の情報を表 3-3、粉碎後の各食品試料の外観写真を図 3-1 に示す。EFSA 法、酵素法の性能評価には、同一日に粉碎・小分けした食品試料を用いた。[3-2-2]、[3-5]、中課題 2 で用いた食品試料も同様に、均質化・小分けして保存した。

表 3-3. 性能評価に用いた製品の情報と粉碎・小分け後の保存温度

食品	脂質濃度 (栄養成分表示)	1 袋 (1 個) あた りの内容量	均質にした製品の ロット別の賞味期限等	保存温度
揚げせんべい	3.5 g ※1 枚(12～13 g)あたり	130～140 g/袋	①2017.12.26 : 8.5 袋 ②2017.12.26 : 5 袋	室温 (25℃)
鶏から揚げ	12.0%	275 g/袋	①2018.7.23 : 8 袋 ②2018.7.3 : 1 袋	冷凍 (-20℃)
揚げ即席麺	16.6% ※スープ含む	めん 91 g/袋	①2018.3.2 : 4 袋 ②2018.4.13 : 5 袋 ③2018.4.13 : 5 袋 ④2018.4.13 : 5 袋	室温 (25℃)
ビスケット	29.6%	100 g/袋	①2018.3.2 : 2 袋 ②2018.3.2 : 4 袋 ③2018.3.14 : 4 袋	室温 (25℃)
かりんとう	29.1%	110 g/袋	①2017.11.23 : 7 袋 ②2017.12.1 : 5 袋	室温 (25℃)
天ぷら	-	約 60 g/個	①2017.8.28 製造 : 30 個	冷凍 (-20℃)

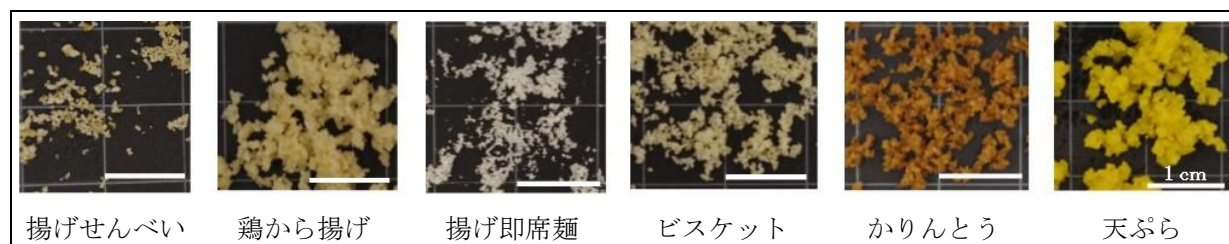


図 3-1. 粉碎後の食品試料の外観写真。1 cm 目盛の方眼シート上に試料を置いて撮影した。鶏から揚げと天ぷらはペースト状であった。

3-1-3. 分析法の性能の検証方法

3-1-3-1. 性能の検証

各食品の標準試薬添加試料について、JIS Z 8402-3:1999 に倣い、5 回の併行の繰返し試験を、分析日を変えて 4 回行った ($n=5 \times 4$ 回)。

3-1-3-2. 添加回収試験

- ・ 試料に添加する標準試薬は、3-MCPD ジオレエート (3-MCPD-O/O：和光純薬工業) 及びグリシジルオレエート (G-O：和光純薬工業) とした。EFSA 法では PLE セルに、酵素法では 10 mL 容スクリューキャップ付試験管に、予め均質にした試料 [3-1-2] を採取した後、標準試薬を添加し、15 分間静置した。なお、標準試薬を試料の均質化時に添加すると、標準試薬と試料の均質性が低下すること、数十倍量の標準試薬を要するためコスト高になることから、本研究では分析用の容器内で、均質化後の試料への添加とした。
- ・ 標準試薬の添加は、食品が含有する油脂に対する各分析種の濃度（各遊離型当量）として、
 - ① 低濃度：0.1～0.2 mg/kg。目標とする定量下限の濃度。
 - ② 中濃度：1～2 mg/kg。EFSA 法の検量線の間濃度。の 2 点の濃度で行った。標準無添加の試料も毎回分析した。
- ・ 添加回収率は、Codex Alimentarius Commission Procedural Manual Twenty-fourth edition の Table 1 に倣い、100 µg/kg～10 mg/kg の場合の許容回収率を 80～110% とした。
- ・ 精度は、AOAC Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements、2016 年を参考にし、HorRat_(r) 値 [= (実際の室内再現精度 RSD_r) / (Horwitz 式の修正式 (Thompson 式) を用いた推定室間再現精度 $\times 0.67$ (2/3))] を算出し、2 以下であれば妥当とした。

3-1-3-3. 定量下限

本研究の定量下限の目標は、油脂に対して 0.1 mg/kg 及び食品に対して 0.025 mg/kg を目安とし、少なくとも食品に対して 0.1 mg/kg とした。定量下限の算出には、性能評価に用いた食品試料（表 3-3）の中で、3-MCPDE 及び GE が最も低濃度であった鶏から揚げを用いた。

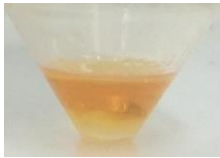
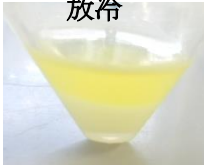
定量下限は、EFSA supporting publication 2015: EN-779¹⁾を参考にし、3-MCPDE 濃度 (3-MCPD 当量) の定量下限は、面積比 [3-MCPD/3-MCPD- d_5] の標準偏差 ($n=6$) $\div$ 内標準検量線の傾き $\times$ 添加した内標準の絶対量 $\div$ 食品試料の平均採取量 ($n=6$) $\times 7.2$ 、GE 濃度 (グリシドール当量) の定量下限は、面積比 [3-MBPD/3-MBPD- d_5] の標準偏差 ($n=6$) $\div$ 内標準検量線の傾き $\times$ 添加した内標準の絶対量 $\div$ 食品試料の平均採取量 ($n=6$) $\times 7.2 \times$ グリシドール分子量 $74.08 \div$ 3-MBPD 分子量 154.99 から算出した。

3-2. 【小課題 1-1, 1-2】 EFSA法の検討

3-2-1. EFSA 法 PLE 時の食品試料の脱水

[1-5-1]に示した通り、EFSA 法では PLE により食品から脂質を抽出する。PLE セルに食品試料を採取する前に、食品試料にポリアクリル酸ナトリウム及び石英砂をよく混合し、脱水するが、乳鉢やアルミ製平皿上で混合した場合、一部の食品試料では抽出物に水分又は沈殿物が残存した（表 3-4）。

表 3-4. 食品試料と脱水剤を乳鉢で混合後、PLE・溶媒留去後の抽出物への水分残存

食品試料	食品中の水分濃度	脂質抽出・溶媒留去後の抽出物の外観	
揚げせんべい	4.6% ^{a)}		水分の残存あり。 目視では 5 食品で最も水分残存量が多かった。
鶏から揚げ	60.8% ^{b)}		ゲル状の沈殿物あり。
揚げ即席麺	3.3% ^{a)}		水分の残存なし。
ビスケット	2.1% ^{c)}	放冷  急冷 	溶媒留去後、 放冷では 2 層に分離した。 急冷では分離しなかった。
かりんとう	2.9% ^{a)}		水分（水滴）の残存あり。

水分濃度の試験法：^{a)} 常圧加熱乾燥法、^{b)} 常圧加熱乾燥法・乾燥助剤法、^{c)} 減圧加熱乾燥法

抽出・溶媒留去後の水分の残存

水分残存の有無に、食品中の水分濃度の高・低との関連はなかった（表 3-4）。抽出物を目視で確認したところ、性能評価に当初用いた 5 食品（表 3-3、天ぷらを除く）の中で最も水分残存量が多い食品は揚げせんべいであった。同様に、焼きせんべい及び[3-5]で用いた揚げおかきを、乳鉢上でポリアクリル酸ナトリウム及び石英砂と混合し、PLE・溶媒留去を行ったところ、水分が残存した（図 3-2）。この結果より、米菓（特にせんべい）は水分が残存しやすい食品であることが推測された。

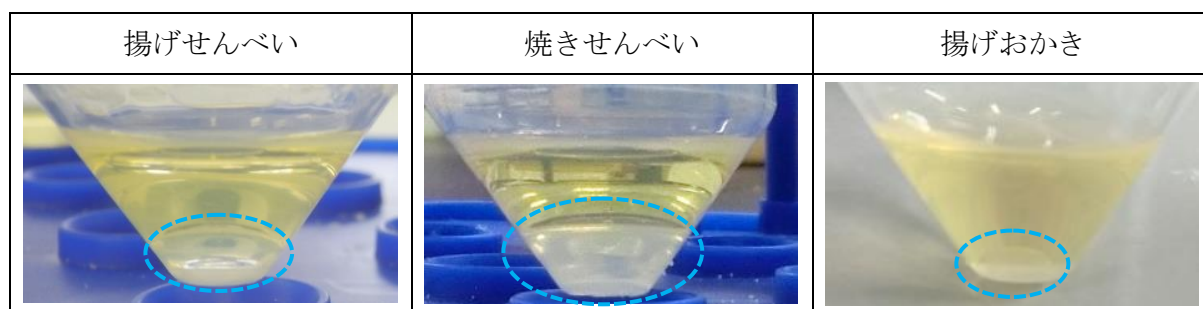


図 3-2. 乳鉢で混合後、脂質抽出・溶媒留去を行った場合の抽出物の外観。

囲み部分が残存した水分。食品試料は米菓 3 製品。

抽出物への水分の残存をなくすため、PLE 時の脱水剤の種類の変更（硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、珪藻土）や、溶媒留去後に抽出物に残存した水分の硫酸ナトリウムによる脱水等の検討を行った。その中で、最も簡便かつ効果的であったのが、PLE 前の試料と脱水剤を混合する容器の変更であった。乳鉢や平皿のような横長の容器から、遠沈管、ファルコンチューブ等の縦長の容器に変更し、スパテラで激しく混合することで、揚げせんべい、かりんとうでは PLE 後の抽出物中の水分残存を無くすことができた。縦長の容器でも、混合が不足すると抽出物中に水分が残存することがあったため、米菓では特に念入りに混合するよう注意すること [1-5-1 参照]。また、容器の変更により、鶏から揚げの PLE 後の抽出物中の沈殿物残存も無くすことができた。

以降の実験では、食品試料と脱水剤の混合容器として、30 mL もしくは 50 mL 容の遠沈管又は 50 mL 容のファルコンチューブを用いた。

ビスケットからの抽出物

表 3-4 に示した通り、抽出・溶媒留去後に放冷すると、ビスケットからの抽出物は 2 層に分離した。油脂を赤外分光（IR）分析すると、 2900 cm^{-1} 付近にメチル基（ $-\text{CH}_3$ ）、メチレン基（ $-\text{CH}_2-$ ）、 1740 cm^{-1} にエステル基（ $-\text{COO}-\text{R}$ ）、 1150 cm^{-1} 付近にエーテル基（ $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ）の吸収帯が現れる。ビスケットからの抽出物を IR 分析すると、上層、下層ともに油脂特有の吸収スペクトルが得られた（図 3-3a. A1, A2）。また、急冷すると抽出物は分離しなかった（表 3-4）。これらのことから、放冷後に分離した下層は残存した水分ではなく、融点の異なる油脂であると判断した。一方、揚げせんべいからの抽出物では、上層は油脂特有のスペクトルが得られたが（図 3-3b. B1）、下層は 1650 cm^{-1} 、 3300 cm^{-1} 付近に水酸基（ $-\text{OH}$ ）由来のスペクトルが得られたため、油脂ではなく水分であると推測した（図 3-3b. B2）。

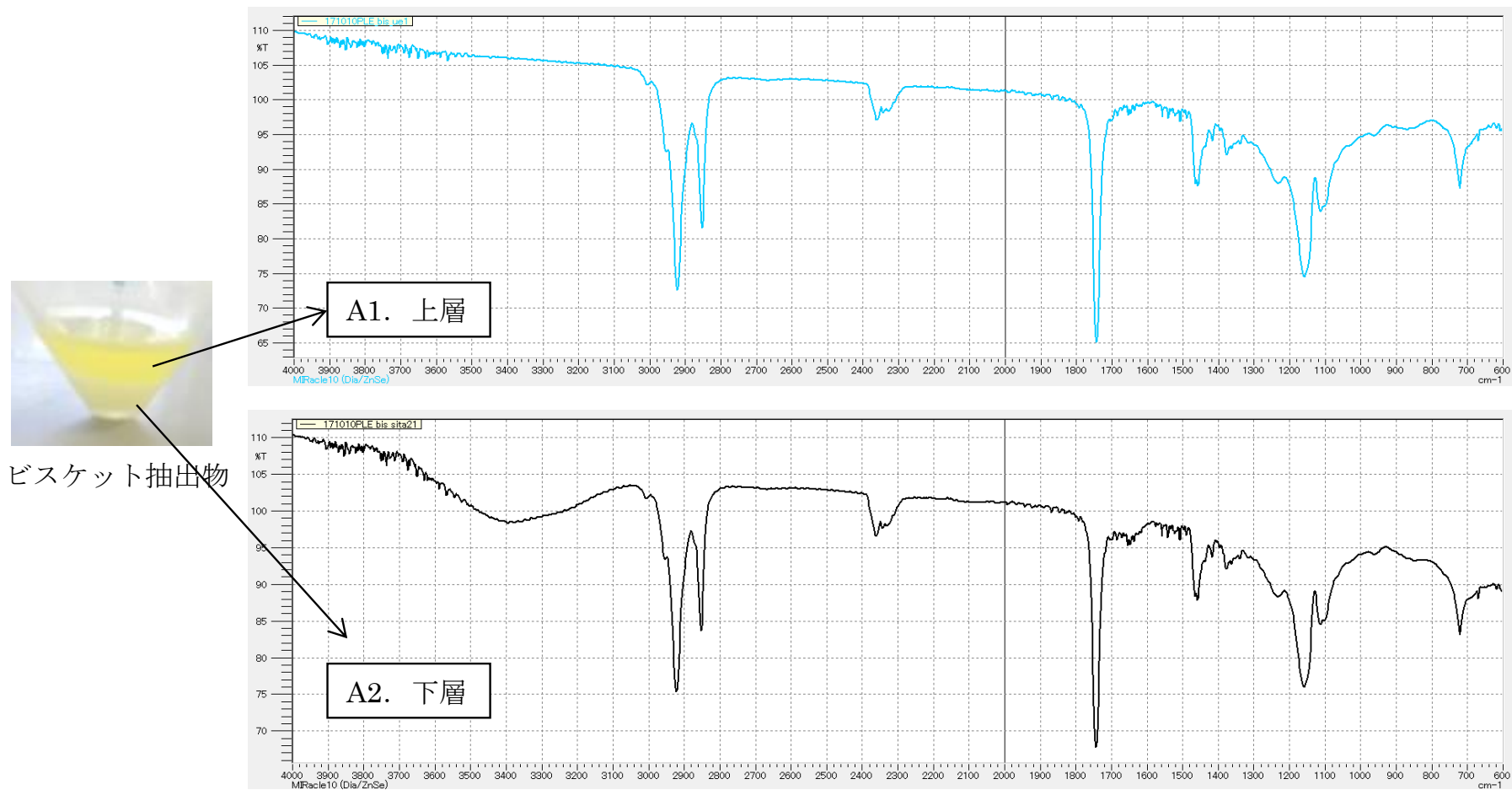


図 3-3a. ビスケット抽出物の上層 (A1)・下層 (A2) の IR スペクトル分析結果 (縦軸: 透過率 (%), 横軸: 波数 (cm⁻¹))

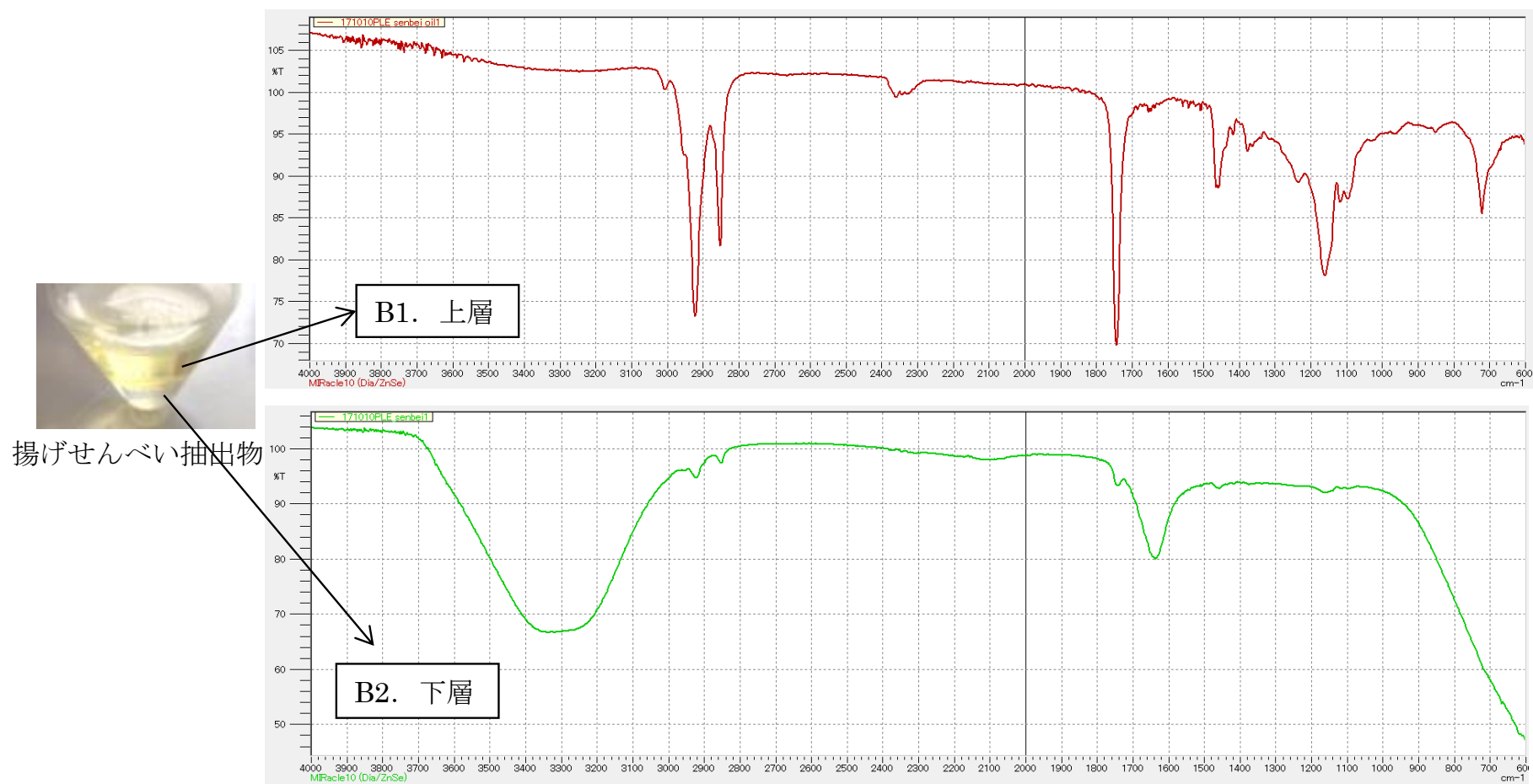


図 3-3b. 揚げせんべい抽出物の上層 (B1)・下層 (B2) の IR スペクトル分析結果 (縦軸: 透過率 (%), 横軸: 波数 (cm⁻¹))

3-2-2. EFSA 法の PLE による脂質抽出：かりんとうの抽出不良

EFSA 法では、PLE によって食品から脂質を抽出し、用いた食品試料の量と抽出した脂質量から食品中の脂質濃度を求め〔1-5-1：式 1-1〕、抽出した脂質中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度を分析する。食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度は、抽出した脂質中の 3-MCPDE 濃度または GE 濃度×食品中の脂質濃度〔1-7-2：式 1-5〕から算出する。性能評価に用いた食品試料（表 3-3）の、エーテル抽出法及び PLE によって抽出した脂質量から得られた脂質濃度を表 3-5 に示す。PLE による脂質濃度は、性能評価における添加回収試験の 4 回の分析（1 回の分析につき $n=12$ （高濃度添加 $n=5$ 、中濃度添加 $n=5$ 、無添加 $n=2$ ））の結果から算出した。

表 3-5. エーテル抽出法、PLE による食品中の脂質濃度

食品試料	エーテル抽出法による脂質濃度 (%) ^{a)} ($n=2$)	PLE による平均脂質濃度±標準偏差 (%)			
		1 回目 ($n=12$)	2 回目 ($n=12$)	3 回目 ($n=12$)	4 回目 ($n=12$)
揚げせんべい	27.7, 27.7	26.4±1.0	25.6±0.4	24.9±0.8	25.3±0.4
鶏から揚げ	10.7, 11.0	12.0±0.8	10.8±0.5	11.2±0.5	9.7±0.2
揚げ即席麺	17.6, 17.6	18.0±0.8	19.0±0.7	17.4±0.5	18.0±0.4
ビスケット	26.4, 26.4	26.3±0.2	26.4±0.3	25.7±0.4	26.7±0.1
かりんとう	30.9, 31.8	23.1±0.7	23.3±0.9		
天ぷら	20.8, 20.4	21.9±1.0	19.8±0.3		

^{a)} エーテル抽出法（ソックスレー法）：65℃、16 時間

PLE による食品中の脂質濃度は、揚げせんべい、鶏から揚げ、揚げ即席麺、ビスケット、天ぷらでは、エーテル抽出法による食品中の脂質濃度と同等であった。一方、かりんとうでは、PLE による脂質濃度はエーテル抽出法による脂質濃度と比べて低かった。続いて、この現象は、特定の製品（〔3-2-1〕で用いた製品：かりんとう①）のみで生じるのか、かりんとう全般で生じるのかを把握するため、他 3 製品のかりんとう（かりんとう②～④）を試料とし、〔3-1-2〕に従って脂質濃度を求めた。

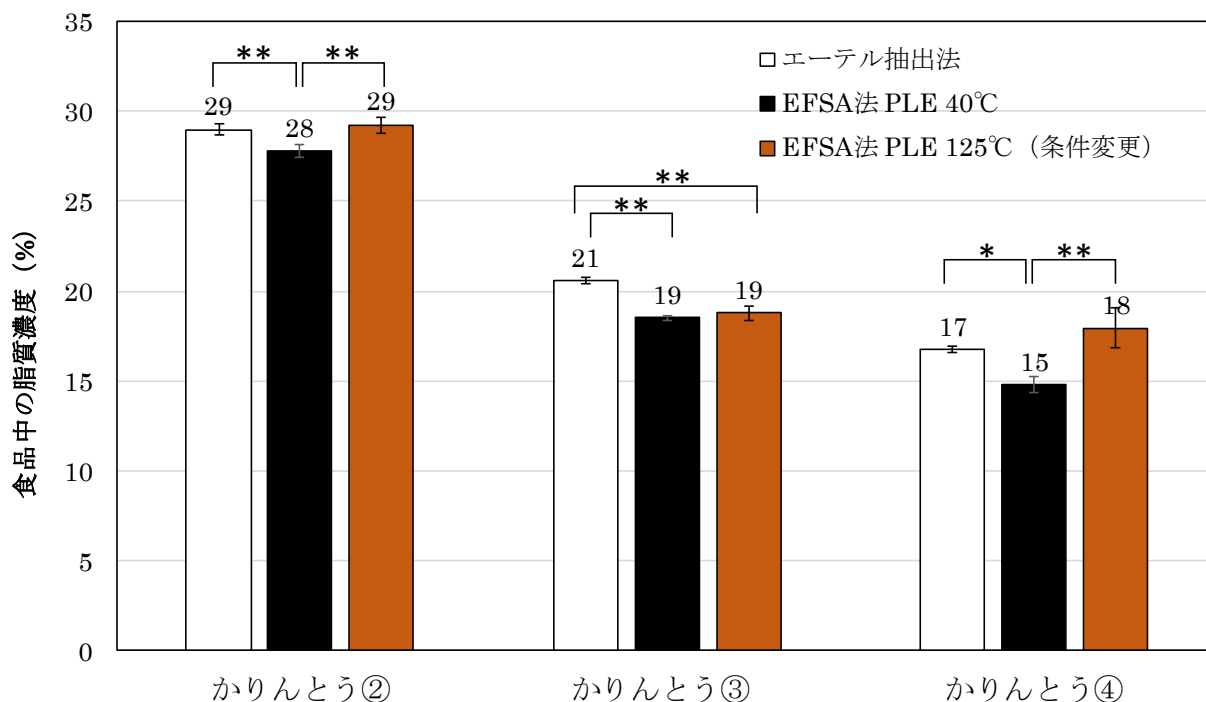


図 3-4. かりんとう 3 製品の脂質濃度 ($n=3$)

□ エーテル抽出法 (ソックスレー法) : 65°C、16 時間

■ EFSA 法 PLE : 40°C、2 サイクル (通常条件)

■ EFSA 法 PLE : 125°C、3 サイクル (条件変更)

Tukey-Kramer 検定 * : $p<0.05$ 、** : $p<0.01$

その結果、かりんとう②～④の 3 製品においても、食品中の脂質濃度は、エーテル抽出法に比べて、EFSA 法の PLE で求めた値の方が 2～3%低く、統計的に有意な差があった (図 3-4 : □、■)。

1 章の[1-5-1]に記載の EFSA 法の PLE 条件 (40°C、2 サイクル、抽出溶媒 : *tert*-ブチルメチルエーテル) では、調製粉乳からの脂質抽出が不十分であることが報告されており、調製粉乳からの脂質抽出時には別条件 (125°C、3 サイクル、抽出溶媒 : 石油エーテル/アセトン/イソヘキサン (2:1:2)) を用いることが報告されている²⁾。

かりんとうにおいて、PLE 条件の抽出温度とサイクル数を 125°C、3 サイクルに変更し、再度脂質濃度を求めた (図 3-4 : ■)。図示していないが、かりんとう①の脂質濃度は、40°C、2 サイクルの PLE では $22.9\pm0.2\%$ ($n=3$) であったのに対し、125°C、3 サイクルの PLE では $29.1\pm2.1\%$ ($n=3$) と抽出効率が改善した。かりんとう②とかりんとう④においても、PLE 条件の変更により、脂質抽出効率に改善が見られた。一方、かりんとう③では、PLE 条件を変更しても脂質抽出効率の改善は見られなかった。

農林水産省と協議の上、PLE 抽出時の 100°C以上の加熱による 3-MCPDE、GE の動態は明らかになっていないこと、抽出温度 125°Cの場合の PLE による脂質濃度はばらつきが大きいことから、本研究ではかりんとうを用いた EFSA 法の性能評価は中止し、次点の試料候補であった天ぷらを用いて性能評価を実施した。

EFSA 法の PLE により得られたかりんとうの脂質濃度が低い一因として、油脂をコーティングしている糖が脂質の抽出を妨害していると推測した。中課題 1-3 の酵素法の抽出法 [2-5-1] によるかりんとうの脂質濃度は、“有機溶媒 (*tert*-ブチルメチルエーテル：イソオクタン (2:1, v/v) 混液) と水溶液” で抽出した場合は $30.4 \pm 1.0\%$ ($n=3$)、有機溶媒のみで抽出した場合 (水溶液なし) は $23.0 \pm 0.6\%$ ($n=3$) であった。そのため、抽出時の水の有無は、かりんとうからの脂質抽出率に影響する一因であると考えられる。かりんとうのように、揚げた後に糖でコーティングされた食品を EFSA 法で分析する場合、“栄養成分表示に記載されている脂質濃度” と “PLE で得られた脂質濃度” が同等であることを確認する必要があるだろう。

3-2-3. 中鎖脂肪酸結合油脂を含む食品の分析

EFSA 法では、エステル型分析種から遊離型分析種へのメタノリシス [1-5-5] 後、窒素ガスを吹き付けて有機溶媒を留去する (溶液量が約 1 mL になるまで) [1-5-6]。完全に有機溶媒が留去されなかった場合、メタノリシスにより生成した脂肪酸メチルが溶液中に残存する。長鎖脂肪酸メチルであれば、次工程のヘキサン洗浄で除去できる。一方、ヤシ油、乳脂等の中鎖脂肪酸結合油脂を含む試料から生成する中鎖脂肪酸メチルは、ヘキサン洗浄では完全に除去しきれない。

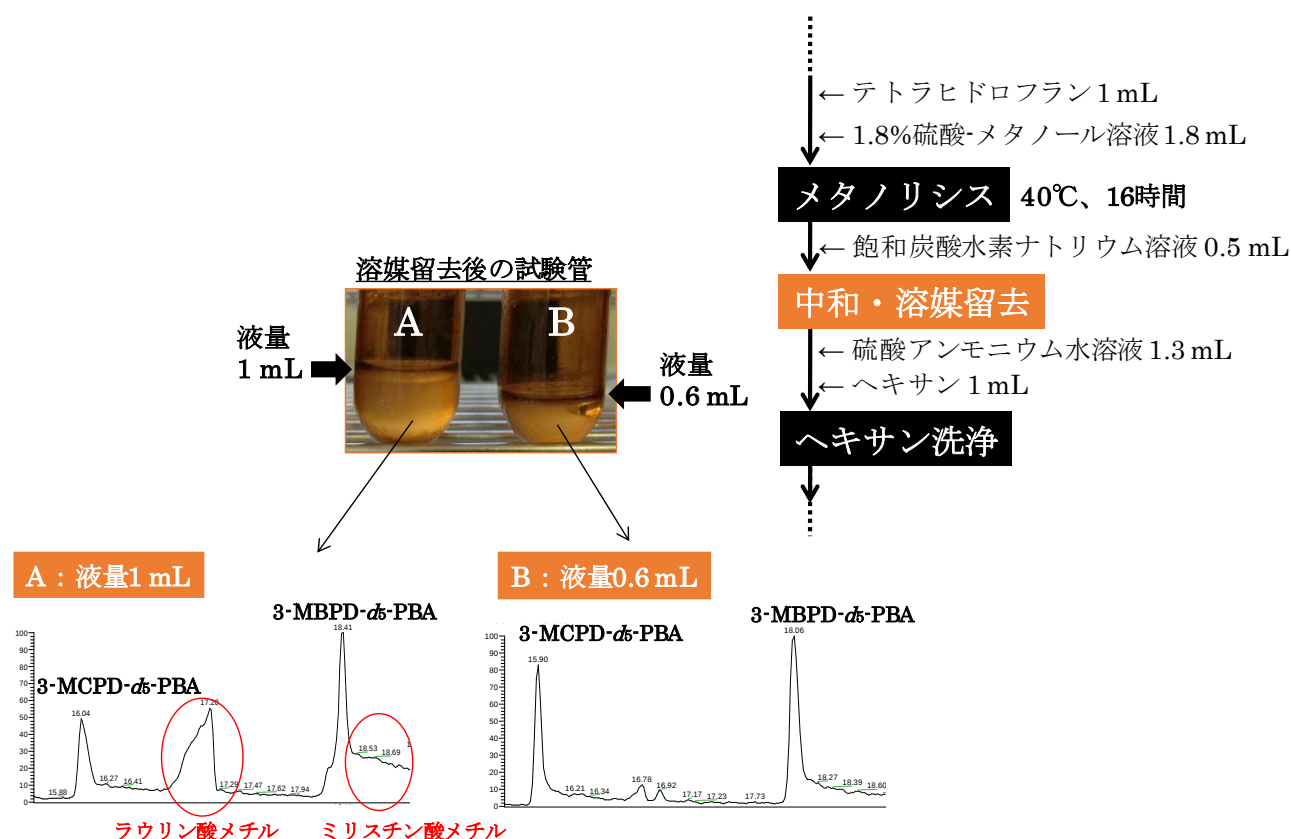


図 3-5. メタノリシス・溶媒留去後の液量の違いによる GC-MS クロマトグラムへの影響

中鎖脂肪酸結合油脂を含む食品を分析する際に、メタノリシス後、液量 1 mL まで溶媒留去した場合 (A)、液量 0.6 mL まで溶媒留去した場合 (B) の GC-MS クロマトグラム (m/z 150)。

赤丸：検出された妨害ピーク (ラウリン酸メチル、及びミリスチン酸メチル)

性能評価に用いた食品（表 3-3）のうちビスケットの分析において、メタノリシス後の溶媒留去を EFSA 法の手順通り、液量 1 mL まで行って検液を調製したところ、GC-MS クロマトグラム上にラウリン酸 (C12:0) メチル及びミリスチン酸 (C14:0) メチルが妨害ピークとして検出された（図 3-5 : A 赤丸）。有機溶媒を完全に除去するため、液量 0.6 mL まで溶媒留去し、検液を調製したところ、妨害ピークは検出されなかった（図 3-5 : B）。そのため、中鎖脂肪酸結合油脂（乳脂、ヤシ油等）を含む試料の場合、液量が 0.5~0.8 mL になるまで溶媒を留去する旨を「1-5-6. 中和・溶媒留去」に注意書きとして記載した。原材料が不明の場合には、念のため、液量が 1 mL 未満になるまで、完全に有機溶媒を留去した方が良好だろう。

3-3. 【小課題 1-3】 酵素法の検討

3-3-1. 短鎖・中鎖脂肪酸結合油脂を含む食品の分析

短鎖及び中鎖脂肪酸結合油脂（乳脂、ヤシ油等）を含む食品を酵素法で分析する際に、2 点の課題があることが分かっている。これら 2 点については、以下の改良を加えた。

【課題①】

乳脂（短鎖脂肪酸結合油脂）を 20%以上含む試料では、加水分解速度が遅くなる⁵⁾。

【改良点】

加水分解時の反応水溶液のリパーゼ量を 2 倍にする。

「調製試薬 2-3-2」において、180 U/mL リパーゼ含有臭化ナトリウム水溶液を調製する。リパーゼ量を 2 倍にしても分析に影響は生じないため、通常の実験において 2 倍にしても問題ない。

【課題②】

中鎖脂肪酸結合油脂の場合、加水分解後に生成した中鎖脂肪酸はヘキサン洗浄では除去できず、GC-MS クロマトグラム上に妨害ピークとして検出される。

【改良点】

EFSA 法の性能評価に用いたビスケットを酵素法で分析したところ、GC-MS クロマトグラム上に中鎖脂肪酸のラウリン酸が妨害ピークとして検出された（図 3-6 : A 赤丸）。中鎖脂肪酸は水にも可溶であるため、ヘキサン洗浄時に除去できていない可能性が示唆された。そこで、水層に溶解する中鎖脂肪酸を除去するため、ヘキサン洗浄の前にエーテル洗浄を追加したところ、中鎖脂肪酸のピークは検出されなかった（図 3-6 : B 下段）。

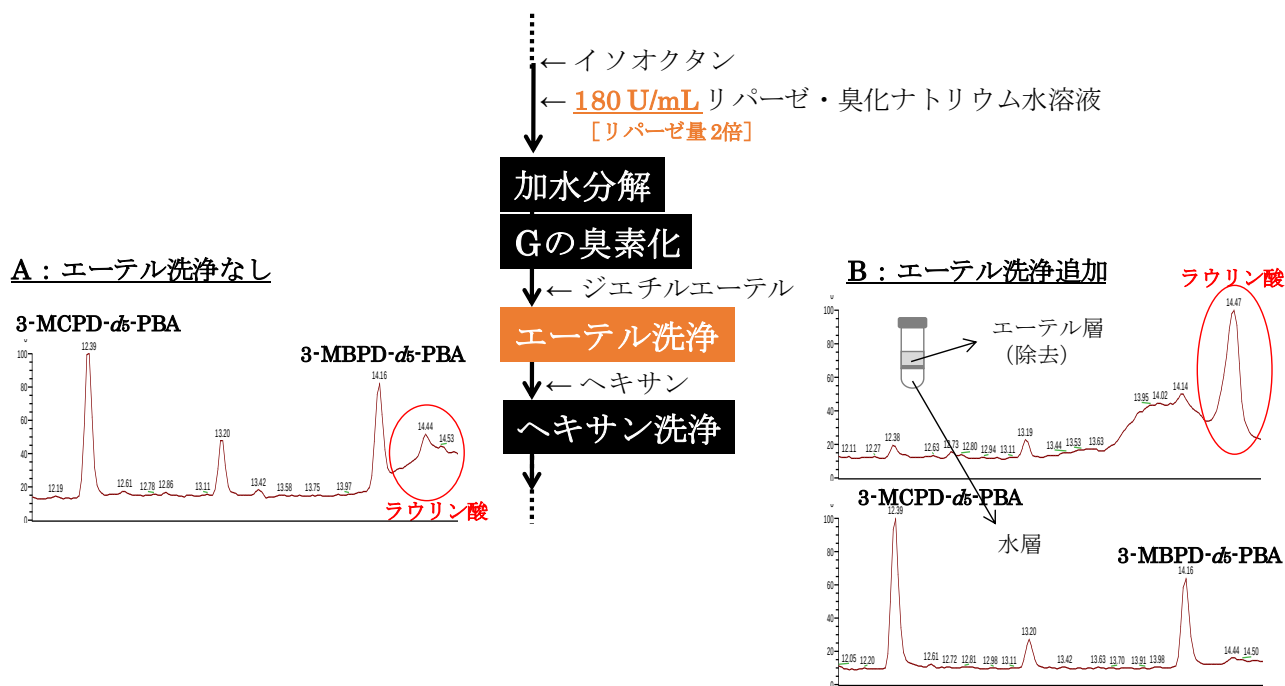


図 3-6. 中鎖脂肪酸による GC-MS クロマトグラムへの影響

酵素法を用いて中鎖脂肪酸結合油脂を含む食品を分析する際に、エーテル洗浄を追加しない場合 (A) と追加した場合 (B) の GC-MS クロマトグラム (m/z 150)。

B の上段：エーテル層（通常は除去する）、**赤丸**：検出された妨害ピーク（ラウリン酸）

B の下段：水層。

エーテル洗浄時に、通常は除去するエーテル層を採取し、窒素を吹き付けて溶媒を留去した。30% (w/v) 臭化ナトリウム水溶液 3 mL を加え、[2-5-5. 誘導体化・抽出] 以降の操作を実施し、検液を調製した。採取したエーテル層を分析したところ、GC-MS クロマトグラム上に中鎖脂肪酸であるラウリン酸 (C12:0) のピークが検出された (図 3-6 : B 上段 **赤丸**)。このことから、エーテル洗浄によりラウリン酸が除去できることが示された。これらの結果から、中鎖脂肪酸結合油脂を含む食品の場合にはエーテル洗浄を追加する旨、[2-5-4] に記載した。なお、中鎖脂肪酸結合油脂を含まない食品の場合にエーテル洗浄を追加しても大きな問題はない。ただし、3-MCPD、3-MBPD とこれらの重水素標識体も一部エーテル層に移行する可能性がある。内標準補正しているため定量値には影響しないが、3-MCPDE、GE が低濃度の食品の場合、感度に影響する可能性があることに留意すること。

3-3-2. 食品の脂質濃度の推定

酵素法では、製品の栄養成分表示の脂質濃度をもとに食品試料の採取量を算出する [2-5-1]。惣菜等、栄養成分表示がなく脂質濃度が不明な食品の場合には、[2-8. 食品中の脂質濃度の推定] に従い、食品中のおおよその脂質濃度を推定する。表 3-3 に示した 6 食品の脂質濃度を表 3-6 に示す。

表 3-6. 食品の脂質濃度の推定結果

	エーテル抽出法による 食品試料の脂質濃度 (%) ^{a)} (<i>n</i> =2)	[2-8] を用いて推定した 脂質濃度±標準偏差 (%) (<i>n</i> =3)
揚げせんべい	27.7, 27.7	27.2±0.5
鶏から揚げ	10.7, 11.0	10.5±0.6
揚げ即席麺	17.6, 17.6	17.9±0.8
ビスケット	26.4, 26.4	25.7±0.2
かりんとう	30.9, 31.8	30.4±1.0
天ぷら	20.8, 20.4	20.9±0.3

a) エーテル抽出法（ソックスレー法）：65℃、16 時間。

[2-8] による脂質濃度の推定値はエーテル抽出法で求めた脂質濃度とほぼ同等であったことから、方法 [2-8] により食品中のおおよその脂質濃度が推定できることが示された。

3-4. 【小課題 1-1, 1-2】EFSA 法と【小課題 1-3】酵素法の性能評価

改良した EFSA 法及び改良した酵素法の両分析法の性能評価を実施した。性能評価に用いた食品試料は、[3-1-2. 食品試料の均質化と小分け] の手順に従い、均質化・小分け・保存した同一試料を用いた。分析法の性能の検証方法は、[3-1-3. 分析法の性能の検証方法] に従った。

3-4-1. EFSA 法の性能評価

EFSA 法の性能評価結果を表 3-7a、表 3-7b に示す。揚げ即席麺を用いて EFSA 法 15 年版を、残りの 4 食品を用いて EFSA 法 17 年版を評価した。全 5 食品において、3-MCPDE の平均回収率は 96.8～99.4%、HorRat_(r)値は 0.14～0.49 (2 未満)、GE の平均回収率は 95.8～100.1%、HorRat_(r)値は 0.16～1.05 (2 未満) と良好な結果であった。なお、今回の性能評価において、揚げ即席麺 (EFSA 法 15 年版) の GE 低濃度添加の HorRat_(r)値のみ 1.05 であり 1 を超えた。EFSA 法 17 年版 (グリシドールの臭素化前に固相抽出追加) を用いて分析すれば、HorRat_(r)値はさらに小さくなると予想する。

3-4-2. 酵素法の性能評価■

酵素法の性能評価結果を表 3-8a、表 3-8b に示す。ビスケットのみ一部改良した方法 (加水分解時のリパーゼ量 2 倍、エーテル抽出追加) で分析した。酵素法は、表 3-3 に示した 6 食品に、中課題 2 で作製した揚げポテトスナックを加えた計 7 食品で性能評価を実施した。3-MCPDE の平均回収率は 93.7～98.5%、HorRat_(r)値は 0.04～0.53 (2 未満)、GE の平均回収率は 94.4～98.4%、HorRat_(r)値は 0.09～0.78 (2 未満) と良好な結果であった。

表 3-7a. EFSA 法の性能評価結果 (3-MCPDE 濃度・食品に対する添加回収率で評価)

食品	分析法	標準の添加濃度 (mg/kg) ※遊離型当量		3-MCPDE 回収率±標準偏差 (%)				平均 回収率 (%) (<i>n</i> =20)	併行相対 標準偏差 (%)	室内相対 標準偏差 (%)	HorRat _(r) 値
		対食品	対油脂	1 回目 (<i>n</i> =5)	2 回目 (<i>n</i> =5)	3 回目 (<i>n</i> =5)	4 回目 (<i>n</i> =5)				
揚げせんべい	EFSA 法	0.3	1.3	96±3.1	100±5.8	98±4.0	95±3.9	97.6	4.4	6.5	0.19
	17 年版	0.03	0.13	100±7.2	101±6.5	96±6.0	98±7.0	98.9	6.8	8.3	0.14
鶏から揚げ	EFSA 法	0.2	2.0	93±7.2	100±9.2	100±2.3	99±2.6	97.8	6.2	9.6	0.44
	17 年版	0.02	0.20	92±8.6	98±8.4	99±6.6	97±4.0	96.6	7.4	10.6	0.34
揚げ即席麺	EFSA 法	0.2	1.3	96±3.8	99±4.2	99±3.6	94±4.5	96.8	4.2	7.1	0.29
	15 年版	0.02	0.13	98±7.6	94±9.8	100±7.8	96±8.5	97.1	8.7	10.5	0.30
ビスケット	EFSA 法	0.3	1.2	96±5.4	97±2.9	98±5.1	101±4.1	98.0	4.5	6.6	0.32
	17 年版	0.03	0.12	98±4.1	98±3.6	96±4.2	98±3.3	97.7	3.9	4.4	0.19
天ぷら	EFSA 法	0.2	1.0	94±6.0	99±5.3	99±5.0	97±5.1	97.1	5.5	7.5	0.41
	17 年版	0.02	0.10	101±6.3	100±6.5	98±5.1	99±8.0	99.4	6.6	7.1	0.49

表 3-7b. EFSA 法の性能評価結果 (GE 濃度・食品に対する添加回収率で評価)

食品	分析法	標準の添加濃度 (mg/kg) ※遊離型当量		GE 回収率±標準偏差 (%)				平均 回収率 (%) (<i>n</i> =20)	併行相対 標準偏差 (%)	室内相対 標準偏差 (%)	HorRat _(r) 値
		対食品	対油脂	1 回目 (<i>n</i> =5)	2 回目 (<i>n</i> =5)	3 回目 (<i>n</i> =5)	4 回目 (<i>n</i> =5)				
揚げせんべい	EFSA 法	0.4	1.6	98±3.6	99±7.3	95±3.0	96±4.0	97.0	4.9	6.2	0.27
	17 年版	0.04	0.16	94±5.4	93±5.0	96±5.2	100±4.4	95.7	5.2	9.1	0.30
鶏から揚げ	EFSA 法	0.2	2.1	100±4.0	101±3.2	100±1.4	99±4.1	100.1	3.4	3.8	0.27
	17 年版	0.02	0.21	102±6.4	89±6.7	97±7.4	96±4.9	95.9	6.7	14.5	0.40
揚げ即席麺	EFSA 法	0.2	1.3	90±10.9	96±4.4	98±7.3	100±6.7	95.8	8.0	12.2	0.76
	15 年版	0.02	0.13	97±7.2	97±6.6	100±5.2	94±3.2	97.1	5.9	8.1	1.05
ビスケット	EFSA 法	0.3	1.3	96±3.4	100±3.2	98±5.0	95±2.7	97.0	3.8	6.3	0.60
	17 年版	0.03	0.13	96±4.6	95±4.6	100±5.3	99±3.2	97.6	4.6	6.5	0.16
天ぷら	EFSA 法	0.3	1.3	100±4.5	100±5.4	95±3.7	98±5.2	98.1	4.8	7.5	0.52
	17 年版	0.03	0.13	95±6.5	101±6.0	98±5.5	101±4.4	98.7	5.7	8.2	0.36

表 3-8a. 酵素法の性能評価結果 (3-MCPDE)

食品	分析法	標準の添加濃度 (mg/kg) ※遊離型当量		3-MCPDE 回収率±標準偏差 (%)				平均 回収率 (%) (<i>n</i> =20)	併行相対 標準偏差 (%)	室内相対 標準偏差 (%)	HorRat _(r) 値
		対食品	対油脂	1 回目 (<i>n</i> =5)	2 回目 (<i>n</i> =5)	3 回目 (<i>n</i> =5)	4 回目 (<i>n</i> =5)				
揚げせんべい	酵素法	0.2	1.2	98±5.0	98±4.4	96±5.8	94±3.8	96.2	5.0	6.8	0.23
		0.02	0.12	93±4.6	95±3.9	94±6.4	93±4.7	93.7	5.3	5.6	0.06
鶏から揚げ	酵素法	0.2	2.0	93±3.4	94±6.9	96±4.6	97±4.2	94.9	5.2	6.7	0.47
		0.02	0.20	96±4.3	100±6.5	97±3.3	96±5.5	97.4	5.2	7.0	0.53
揚げ即席麺	酵素法	0.2	1.0	94±4.7	93±3.7	97±5.9	93±2.9	94.3	4.7	6.1	0.37
		0.02	0.11	94±8.1	95±1.9	93±7.9	93±2.4	93.7	6.3	6.6	0.40
ビスケット	酵素法 一部改良*	0.3	1.2	98±2.6	97±3.4	99±3.2	98±2.4	97.8	3.0	3.6	0.21
		0.03	0.12	99±3.2	97±4.2	99±5.5	98±3.7	98.5	4.3	5.1	0.10
かりんとう	酵素法	0.4	1.3	93±4.7	95±2.8	98±3.0	96±3.1	95.5	3.6	6.4	0.39
		0.04	0.13	94±3.8	96±5.0	94±4.9	93±6.9	94.2	5.6	6.5	0.32
天ぷら	酵素法	0.3	1.0	93±1.6	98±3.8	95±2.5	96±4.3	95.4	3.4	5.9	0.38
		0.03	0.10	94±4.0	97±3.2	95±4.6	98±3.7	96.0	4.1	6.0	0.41
中課題 2 揚げ ポテトスナック	酵素法	0.4	1.2	99±2.1	97±1.2	96±4.0	99±5.8	97.7	3.8	4.8	0.18
		0.04	0.12	96±4.3	98±4.1	98±3.9	97±4.3	97.0	4.3	4.7	0.04

* : [3-3-1]参照。ヘキササン洗浄前にエーテル洗浄を 1 回追加した。

表 3-8b. 酵素法の性能評価結果 (GE)

食品	分析法	標準の添加濃度 (mg/kg) ※遊離型当量		GE 回収率±標準偏差 (%)				平均 回収率 (%) (<i>n</i> =20)	併行相対 標準偏差 (%)	室内相対 標準偏差 (%)	HorRat _(r) 値
		対食品	対油脂	1 回目 (<i>n</i> =5)	2 回目 (<i>n</i> =5)	3 回目 (<i>n</i> =5)	4 回目 (<i>n</i> =5)				
揚げせんべい	酵素法	0.4	1.3	97±3.6	98±2.5	99±2.4	94±5.6	97.3	3.9	6.5	0.22
		0.04	0.13	96±4.6	95±3.3	95±9.0	96±5.4	95.4	6.2	6.6	0.09
鶏から揚げ	酵素法	0.2	2.1	99±3.2	94±2.2	98±4.7	100±1.0	97.5	3.2	6.3	0.30
		0.02	0.21	93±3.8	97±5.6	93±5.1	96±2.4	94.4	4.7	6.8	0.78
揚げ即席麺	酵素法	0.2	1.0	95±5.2	93±3.1	99±1.9	97±2.5	95.9	3.5	6.9	0.48
		0.02	0.10	93±2.5	97±4.1	95±5.3	94±2.5	95.0	4.0	5.7	0.26
ビスケット	酵素法 一部改良*	0.3	1.3	96±3.1	97±2.1	97±3.4	99±1.7	97.6	2.8	3.8	0.23
		0.03	0.13	99±3.7	97±1.8	100±3.2	97±4.6	98.1	3.5	4.4	0.12
かりんとう	酵素法	0.4	1.3	95±4.6	99±4.1	100±3.2	99±2.5	98.4	3.8	6.1	0.61
		0.04	0.13	97±3.0	99±5.6	96±3.8	94±5.4	96.3	4.8	6.5	0.53
天ぷら	酵素法	0.4	1.1	94±2.3	99±2.9	96±1.7	97±4.5	96.3	3.2	6.0	0.54
		0.04	0.11	96±5.1	97±4.4	97±5.7	97±3.3	96.6	4.9	5.0	0.55
中課題 2 揚げ ポテトスナック	酵素法	0.4	1.3	96±3.8	99±1.7	95±3.6	97±6.2	96.7	4.3	5.8	0.24
		0.04	0.13	97±4.3	96±3.0	97±2.1	95±2.7	96.4	3.2	4.0	0.15

* : [3-3-1]参照。ヘキササン洗浄前にエーテル洗浄を 1 回追加した。

3-4-3. 定量下限

性能評価に用いた食品試料（表 3-3）の中で、3-MCPDE 及び GE が最も低濃度であった鶏から揚げを試料とした。6 回の繰り返し分析後、定量下限は EFSA supporting publication 2015: EN-779¹⁾ を参考にして算出した [3-1～3-3 参照]。EFSA 法の分析値は“油脂（抽出した脂質）中の濃度”であるため、“食品中の濃度”の定量下限は、

“油脂中の濃度”の定量下限×PLE により得られた食品中の脂質濃度（ $n=6$ の平均値）から算出した。

定量下限の算出は日を変えて 2 回実施した。

- ・ 1 回目：両分析法ともに、GC-MS のメンテナンス（注入口、イオン源の洗浄）を行った後に定量下限算出用の検液を分析した。
- ・ 2 回目：（EFSA 法）GC-MS をメンテナンスし、EFSA 法 17 年版で抽出・精製した標準試料 6 検体、食品試料 12 検体の計 18 検体を分析後に定量下限算出用の検液を分析した。
（酵素法）GC-MS をメンテナンスし、酵素法で抽出・精製した標準試料 18 検体、食品試料 89 検体の計 107 検体を分析後に定量下限算出用の検液を分析した。

表 3-9. 鶏から揚げを試料として算出した EFSA 法と酵素法の定量下限

分析法	対象試料	3-MCPDE 濃度(mg/kg) (3-MCPD 当量)		GE 濃度(mg/kg) (グリシドール当量)	
		1 回目	2 回目	1 回目	2 回目
EFSA 法 17 年版	油脂（分析値）	0.019	0.011	0.077	0.252
	食品（計算値）	0.002	0.001	0.008	0.027
酵素法	食品（分析値）	0.002	0.011	0.0005	0.010

表 3-9 より、1 回目（GC-MS メンテナンス後）に算出した食品中の濃度の定量下限は、目標とする 0.025 mg/kg よりも低濃度域であり、良好な結果が得られた。2 回目（通常分析後）に算出した食品中の濃度の定量下限は、EFSA 法の 3-MCPDE、酵素法の 3-MCPDE、GE では良好であった。一方、EFSA 法の GE の定量下限は 0.027 mg/kg（グリシドール当量）と目標より高濃度であった。

EFSA 法、酵素法ともに、定量下限には、装置の状態（注入口やイオン源、MS の汚染）が大きく影響することが考えられる。

装置の汚染に大きく影響する要因は、誘導体化に用いる PBA 試薬である。酵素法では PBA の検液への移行及び装置汚染を防ぐため、PBA 及び PBA 誘導体化物の抽出効率が低いヘキサンをあえて使用している。酵素法では 5 日間連続で分析しても目的成分のピーク形状に影響はなかった。一方 EFSA 法では、試料への PBA の添加量が酵素法の約 2.5 倍であり、[1-5-8] の誘導体化・溶媒除去後の試験管内に、PBA が析出した。GC バイアル内で PBA の析出が見られた検液もあった。図 3-7 に EFSA 法の 2 回目の定量下限用の検液分析後（計 24 検体分析後）の GC インサートを示す。壁面、カラム側の入口部分に大量の PBA が付着していた。

EFSA 法では 3 日間連続で分析を行うと、ピーク（特に 3-MBPD-PBA）がテーリングし、感度も大きく低下した。EFSA 法では、分析毎に GC-MS のメンテナンスを実施すること、また装置汚染を抑制するために、① [1-5-8] の上清を 0.2 μm メンブランフィルターでろ過（析出した PBA を除去）して GC-MS 検液とすること、②感度に余裕があれば、添加する PBA 溶液量又は溶液中の PBA 濃度を小さくすることを推奨する。

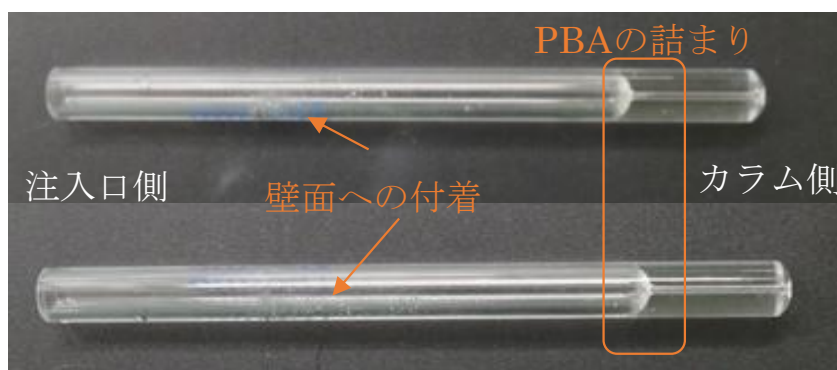


図 3-7. EFSA 法にて 24 検液分析後の GC インサート（向きを変えて撮影）

3-5. 【小課題 1-1, 1-2】 EFSA 法と【小課題 1-3】 酵素法の分析値比較

分析法の性能評価に用いた食品試料（表 3-3）のうち、かりんとうを除いた 5 食品（ $n=2 \times 4$ 回分析）、表 3-10 に示す 6 食品及び中課題 2 のモデル加工食品 3 種からなる 9 食品（ $n=3 \times 1$ 回分析）の計 14 食品について、EFSA 法、酵素法でそれぞれ分析し、分析値の同等性を評価した。EFSA 法は、揚げ即席麺のみ 15 年版、それ以外の 13 食品は 17 年版を用いた。酵素法は、ビスケットのみ改良法 [3-3-1] を用いた。t 検定及び JIS Z 8402-6 【方法 A と方法 B の平均値の比較】を用いて、食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度について、両分析法から得られた分析値の同等性を評価した結果を、表 3-11、表 3-12、表 3-13 に示す。

t 検定は、p 値が >0.05 で有意差なしとした。JIS Z 8402-6 【方法 A と方法 B の平均値の比較】は、 $|(EFSA \text{ 法の平均値} - \text{酵素法の平均値}) \div \sqrt{((EFSA \text{ 法の標準偏差})^2 + (\text{酵素法の標準偏差})^2)|$ が ≤ 2 であれば統計的に有意差なしとした。

表 3-10. EFSA 法及び酵素法による分析値の比較に使用した食品試料

食品	脂質濃度 (栄養成分表示による)
揚げおかき	33.4%
鶏から揚げ ^{a)} (冷凍食品)	10.0%
ビスケット ^{a)}	11.1%
天ぷら ^{a)}	-
ポテトスナック①	36.0%
ポテトスナック②	29.8%

^{a)} 表 3-3 に示した食品とは別の製品

表 3-11. 表 3-3 に示した 5 食品(かりんとうを除く。)中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の EFSA 法及び酵素法による分析値の同等性評価結果 ($n=2 \times 4$ 回分析の結果を評価)

	3-MCPDE		GE	
	t 検定 p 値(両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の 平均値の比較	t 検定 p 値(両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の 平均値の比較
揚げせんべい	0.89	0.07	0.79	0.10
鶏から揚げ	0.91	0.04	0.14	0.67
揚げ即席麺	0.04	1.05	0.26	0.35
ビスケット	0.22	0.48	0.27	0.38
天ぷら	0.18	0.48	0.93	0.02

表 3-12. 表 3-10 に示した 6 食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の EFSA 法及び酵素法による分析値の同等性評価結果 ($n=3 \times 1$ 回分析の結果を評価)

	3-MCPDE		GE	
	t 検定 p 値(両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の 平均値の比較	t 検定 p 値(両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の 平均値の比較
揚げおかき	0.69	0.30	0.69	0.25
鶏から揚げ ^{a)}	0.56	0.26	0.29	0.79
ビスケット ^{a)}	0.72	0.31	0.26	0.94
天ぷら ^{a)}	0.98	0.01	0.88	0.10
ポテトスナック①	0.26	0.36	0.59	0.38
ポテトスナック②	0.91	0.04	0.19	0.49

^{a)} 表 3-11 に示した食品とは別の製品

表 3-13. 中課題 2 で用いたモデル加工食品 3 種中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の EFSA 法及び酵素法による分析値及びその同等性評価結果
($n=3 \times 1$ 回分析の結果を評価)

食品	食品中の 3-MCPDE 濃度 (mg/kg)		t 検定 p 値 (両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の平均値の比較	食品中の GE 濃度 (mg/kg)		t 検定 p 値 (両側)	JIS Z 8402-6 方法 A と方法 B の平均値の比較
	EFSA 法 ($n=3$)	酵素法 ($n=3$)			EFSA 法 ($n=3$)	酵素法 ($n=3$)		
中課題 2 揚げスナック (160℃、45 秒)	0.647	0.636	0.45	0.66	0.341	0.354	0.62	0.29
	0.617	0.645			0.390	0.360		
	0.634	0.648			0.358	0.354		
中課題 2 焼きクラッカー (未加熱生地)	0.259	0.295	0.97	0.02	0.160	0.167	0.19	1.16
	0.278	0.268			0.149	0.169		
	0.310	0.286			0.153	0.157		
中課題 2 焼きクラッカー (200℃、20 分)	0.403	0.405	0.56	0.44	0.194	0.210	0.85	0.12
	0.411	0.393			0.231	0.211		
	0.394	0.396			0.205	0.203		

t 検定、JIS Z 8402-6 【方法 A と方法 B の平均値の比較】

揚げ即席麺を除く 13 食品試料を用いて、EFSA 法 17 年版と酵素法から得られた食品中の 3-MCPDE 濃度（3-MCPD 当量）、GE 濃度（グリシドール当量）を評価した結果、両分析法間で統計的な差がないことが示された（表 3-11、表 3-12、表 3-13）。

EFSA 法 15 年版と酵素法から得られた揚げ即席麺の 3-MCPDE 濃度は、t 検定では有意差あり、JIS Z 8402-6 では有意差なしであった。t 検定において有意差ありとなった要因が試料にある（揚げ即席麺特有）のか、EFSA 法 15 年版にあるのかを明らかにするためには、EFSA 法 17 年版と酵素法で分析した揚げ即席麺の分析値比較を行う必要があるだろう。

回帰式

重み付きデミング回帰による分析結果を表 3-14、表 3-15 に示す。分析の標準偏差が分析値に比例する（変動係数が一定である）と仮定し、データ解析ソフト R のパッケージ `mcr` を用いて計算した。

表 3-14. 表 3-3 に示した 5 食品（かりんとうを除く）中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の EFSA 法及び酵素法による分析値の重み付きデミング回帰分析結果（ $n=2 \times 4$ 回分析の結果を解析）

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPDE	切片	0.000	0.004	-0.013	0.013
	傾き	1.042	0.044	0.902	1.181
GE	切片	-0.004	0.003	-0.013	0.005
	傾き	1.069	0.058	0.885	1.254

a) 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した

表 3-15. 表 3-10 に示した 6 食品及び表 3-13 に示した 3 食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度の EFSA 法及び酵素法による分析値の重み付きデミング回帰分析結果（ $n=3 \times 1$ 回分析の結果を解析）

		係数	標準誤差 ^{a)}	95%信頼区間	
				下限	上限
3-MCPDE	切片	0.001	0.001	-0.002	0.003
	傾き	1.004	0.009	0.982	1.025
GE	切片	0.002	0.006	-0.011	0.015
	傾き	0.982	0.040	0.887	1.078

a) 標準誤差はジャックナイフ法によって算出した

表 3-14、表 3-15 より、3-MCPDE、GE とともに傾きと切片の 95%信頼区間はそれぞれ 1、0 を含むことから、回帰分析においても、EFSA 法から得られた食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度と酵素法から得られた食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度は同等であると判断した。

EFSA 法、酵素法の分析値の同等性評価に用いた 14 食品（市販の 11 製品及び中課題 2 の 3 モデル加工食品）の 3-MCPDE 濃度（3-MCPD 当量）及び GE 濃度（グリシドール当量）の平均をプロ

ットした（縦軸：EFSA 法、横軸：酵素法）グラフを図 3-8 に示す。EFSA 法は、揚げ即席麺は 15 年版、他の 13 製品は 17 年版を用い、酵素法はビスケットのみ一部改良した方法（酵素量 2 倍、エーテル洗浄追加）を用いた。

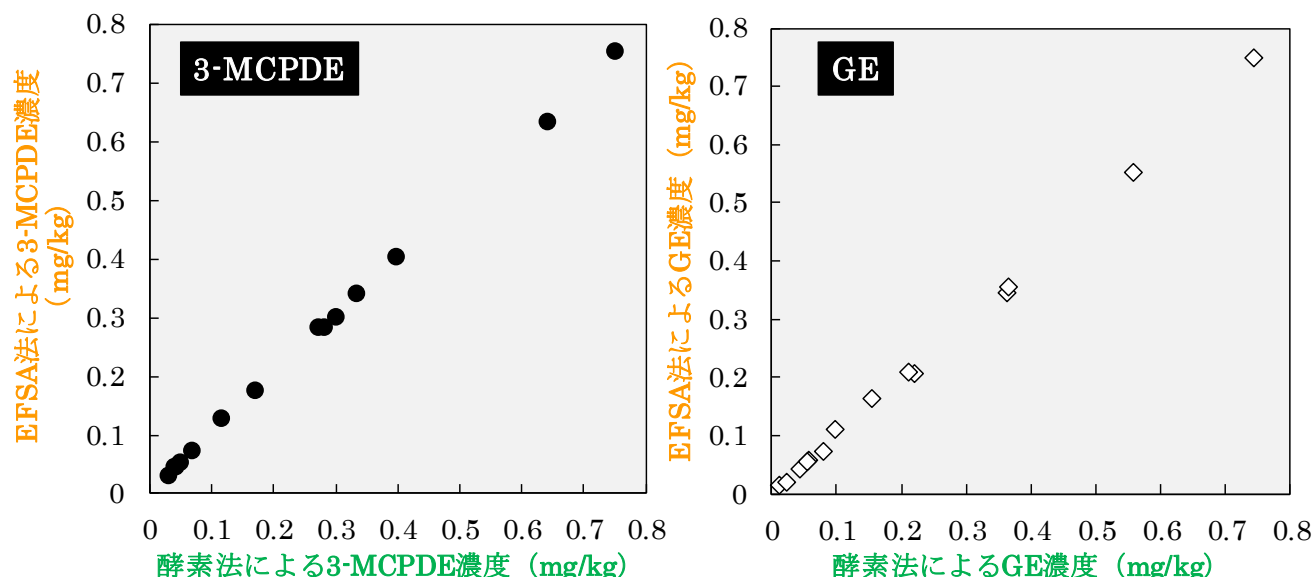


図 3-8. EFSA 法、酵素法の分析値の同等性評価に用いた 14 食品（表 3-3 に示した食品のうちかりんとうを除く 5 製品（ $n=2 \times 4$ 回分析）と表 3-10 に示した 6 製品及び中課題 2 の 3 モデル加工食品（ $n=3 \times 1$ 回分析））中の 3-MCPDE 濃度（3-MCPD 当量：●）、GE 濃度（グリシドール当量：◇）の平均プロット（縦軸：EFSA 法、横軸：酵素法。）

3-6. 中課題 1 の要約

小課題 1-1 及び小課題 1-2 において EFSA 法、小課題 1-3 において酵素法の性能評価を実施したところ、食品の種類によって、EFSA 法では抽出した脂質への水分残存、酵素法では夾雑物による定量妨害が生じたため、両分析法を一部改変した。改良後の両分析法の性能は、ともに添加回収率は 80～110% の範囲内、HorRat_w 値 < 2 と良好であった。また、EFSA 法 17 年版と酵素法で得られた食品中の 3-MCPDE 濃度、GE 濃度は同等であることが確認できた。

油脂を含む食品を分析する場合、EFSA 法の食品からの脂質抽出法は“高圧溶媒抽出 (PLE)”であり、特殊な装置を必要とし、GC-MS 検液の調製に 2～3 日を要する。一方、酵素法の脂質抽出法は“液液分配”であるため、特殊な装置がなくとも実施でき、GC-MS 検液の調製は 1 日で完了する。

EGC-MS のメンテナンス（注入口、イオン源洗浄等）後には、EFSA 法、酵素法ともに、食品中の 3-MCPDE 及び GE の定量下限は、いずれも目標の 0.025 mg/kg 未満（遊離型当量）であった。ただし、用いる誘導体化試薬が酵素法と比較して高濃度である EFSA 法は、メンテナンス後に 18 検体を分析してから定量下限算出用の検液を分析すると、GE の定量下限が目標よりも高濃度となった。一方、酵素法はメンテナンス後に 107 検体を分析した後でも、3-MCPDE、GE ともに定量下限の目標を達成できた。

これらの結果より、酵素法は EFSA 法と比べて分析時間を 1/2～1/3 に短縮でき、さらに GC-MS のメンテナンス頻度も下げることができるため、作業効率が良い（迅速、簡便）といえる。よって、油脂及び油脂を含む食品中の 3-MCPDE、GE の分析法として、酵素法を提案する。

本研究課題においては、改良した EFSA 法及び酵素法の単一機関による性能評価を実施したが、今後、合同試験を実施し、複数機関による性能評価を実施する必要があると考える。