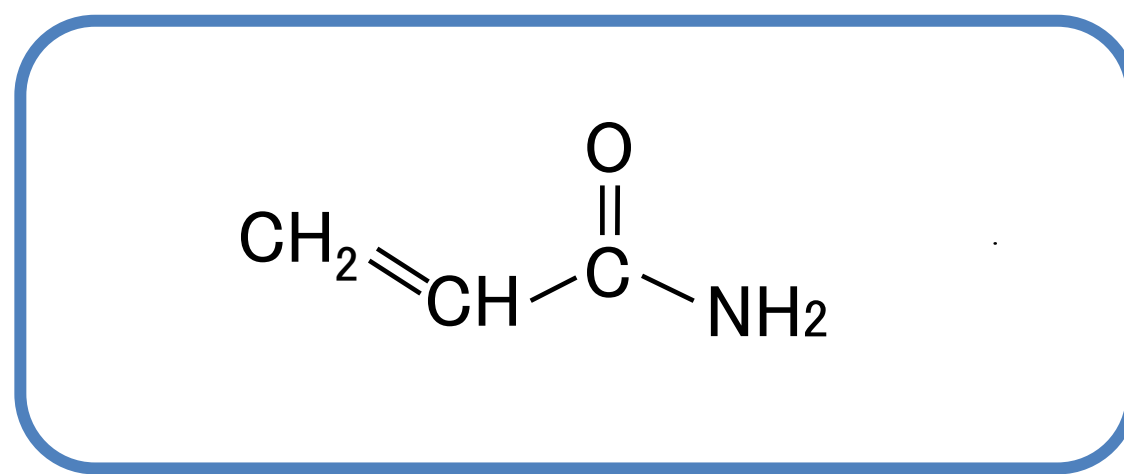


ポテトスナック、ビスケット中のアクリルアミド試験法について

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター(FAMIC) 有害物質等分析調査統括チーム

1. はじめに

2002年4月、スウェーデン食品庁、ストックホルム大学が高温調理した馬鈴薯や穀物加工品にアクリルアミドが含まれることを世界に向けて発表した。国際がん研究機関は、「ヒトにおそらく発がん性がある物質」と評価している。FAO/WHO食品添加物専門家会議は、アクリルアミドを長期間取り続けることにより健康への悪影響の懸念があるとして、食品中の濃度を低くするための適切な努力を継続すべきであると勧告した。また、コーデックス委員会は、「食品中のアクリルアミド低減に関する実施規範」を策定し、加盟国が食品中のアクリルアミド低減に取り組むことを勧告している。農林水産省においても、アクリルアミドを優先的にリスク管理を行うべき有害化学物質と位置づけ、含有量や摂取量が多い加工食品等を対象として含有実態等の調査を行っており、FAMICの有害物質等分析調査統括チームでは、これらの調査に協力するため分析体制を整備している。昨年11月、農林水産省から食品関連事業者の自主的な取組を支援するため、「食品中のアクリルアミドを低減するための指針」が策定・公表された。この指針に基づき、業者によるアクリルアミドの低減対策の実施が想定されている。



2. 試験方法

概要

試料からアクリルアミドを抽出し、固相抽出カラムで精製した後、キサントヒドロールを用いて酸性条件下、誘導体化し、GCMSで測定する。

2.1 試料

ポテトスナック、ビスケットをフードプロセッサーで粉砕、均一化し試料とした。(Fig.1)



Fig.1 試料の粉砕

2.2 試薬・試液

アクリルアミド
アクリルアミド-d₃
誘導体化試薬: キサントヒドロール(10%メタノール溶液)
Sep-Pak® Plus AC-2カートリッジ400mg (Waters 社)
Sep-Pak® Plus C18カートリッジ360mg (Waters 社)
その他の試薬: 残留農薬分析用を使用

2.3 測定条件

2.3.1 GC条件

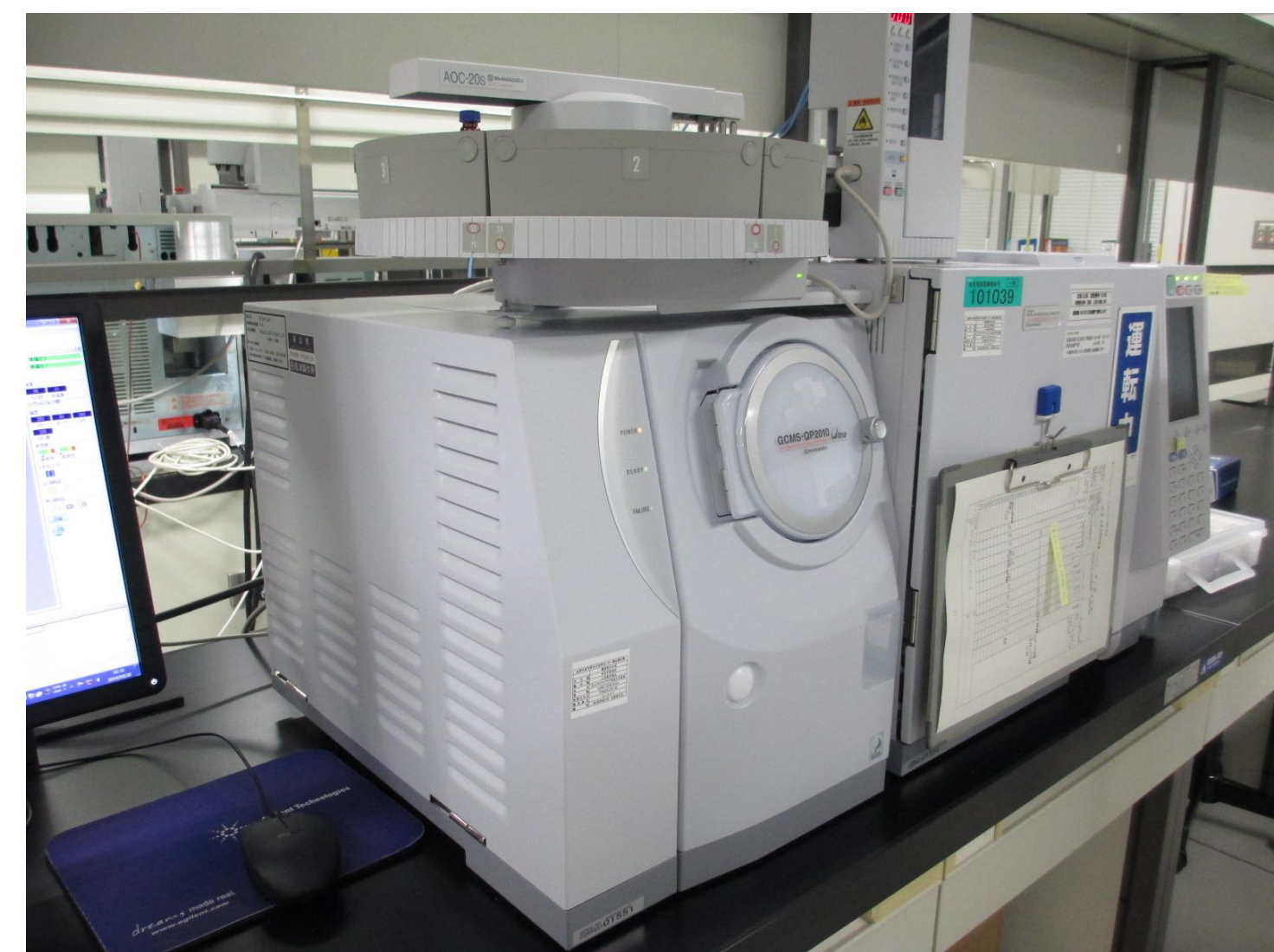
分離カラム : 液相5%フェニル-メチルシロキサン、
内径0.25 mm、長さ30m、膜厚0.25 μm
(使用カラム: DB-5ms: Agilent社)
カラム温度 : 40 °Cで2分間保持後、毎分20°Cで昇温し、
300 °Cに到達後、10分間保持
注入方式 : スプリットレス
注入量 : 1 μL
注入口温度 : 250°C
キャリアーガス: ヘリウム1.0 mL / min

2.3.2 MS条件

イオン化電圧: 70 eV
イオン源温度: 230°C
イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)
選択イオン: Table.1のとおり

Table.1 選択イオン

分析種	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)
アクリルアミド誘導体	251	234
アクリルアミド-d ₃ 誘導体	254	



GCMS (QP-2010Ultra)

2.5 標準溶液の調製

アクリルアミド標準原液(1000mg/L): アクリルアミド10mgを10ml容の全量フラスコに量り採り、純水で定容した。これをメタノールで希釈し、100 mg/L、10mg/L、1mg/L、0.1mg/Lの溶液を調製した。
アクリルアミド-d₃標準原液(1000mg/L): アクリルアミド-d₃、10mgを10ml容の全量フラスコに量り採り、メタノールで定容した。これをメタノールで希釈し、添加用内標準液10mg/L溶液を調製した。

2.6 試験溶液の調製

試料 3gに水 100ml、内標準物質(アクリルアミド-d₃)0.001mg及びヘキサンを加え、ホモジナイザーを用いて約1分間攪拌した後、全量を共栓付き三角フラスコに移し、10分振とう抽出した。内容物を遠心分離管に移し、遠心分離した後、水層をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過し、ろ液40mlを得た。(Fig.2)
あらかじめメタノール、水でコンディショニングしたSep-Pak® AC-2(AC)カートリッジ及びアセトン、水でコンディショニングしたSep-Pak® C18(ODS)カートリッジを連結し、流速5 ml/分で通液し、アクリルアミドをACカートリッジに吸着させた。(Fig.3)
ACカートリッジを取り外し、窒素ガスを通気して水分を除去後、メタノール 5mlでアクリルアミドを溶出した。溶出液に10%(w/v)ジエチレングリコールのメタノール溶液、約0.1mlを加えて減圧濃縮後、乾固した。
残留物をメタノール1mlに溶解し、10%(w/v)キサントヒドロールのメタノール溶液0.1 ml、0.3 mol/Lの塩酸メタノール溶液0.1 mlを加え、40°Cの水浴中で2時間、誘導体化反応を行った。(Fig.4)
反応液を窒素気流下、40°Cで乾固し、水5ml及び塩化ナトリウム約2gを加え、酢酸エチル2mlを加えて振とう抽出し、GCMS試験溶液とした。



Fig.2 ろ過

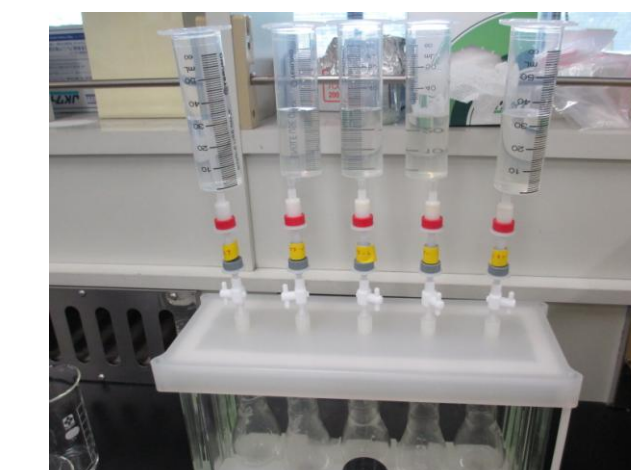


Fig.3 固相抽出



Fig.4 誘導体化

3. 検証結果

3.1 検量線

アクリルアミド標準溶液を0~2.5mg/Lの範囲で、12の検量点濃度に相当する量をガラス製試験管にとり、内標準として、それぞれ0.04mlの10 mg/Lアクリルアミド-d₃溶液を添加した。
10%(w/v)キサントヒドロールのメタノール溶液0.1 ml、0.3 mol/Lの塩酸メタノール溶液0.1 mlを加え、40°Cの水浴中で2時間、誘導体化反応を行った。反応液を窒素気流下、40°Cで乾固し、水5 ml及び塩化ナトリウム約2 gを加え、酢酸エチル2mlで抽出し、検量線溶液とした。
定量はGCMS(SIM)測定で得られたクロマトグラムについて、内標準のアクリルアミド-d₃誘導体に対するアクリルアミド誘導体のピーク高さ比(AA/ISTD)を求めて内標準法により行った。
検量線溶液12点をGCMSでそれぞれ3回ずつ測定し、この3点を平均した検量点で0.005~0.25mg/L、0.25~2.5mg/Lで検量線を作成したところ、それぞれR²=0.995以上の高い相関が得られ、幅広い濃度範囲で良好な直線性が得られた。(Fig.5、Fig.6)

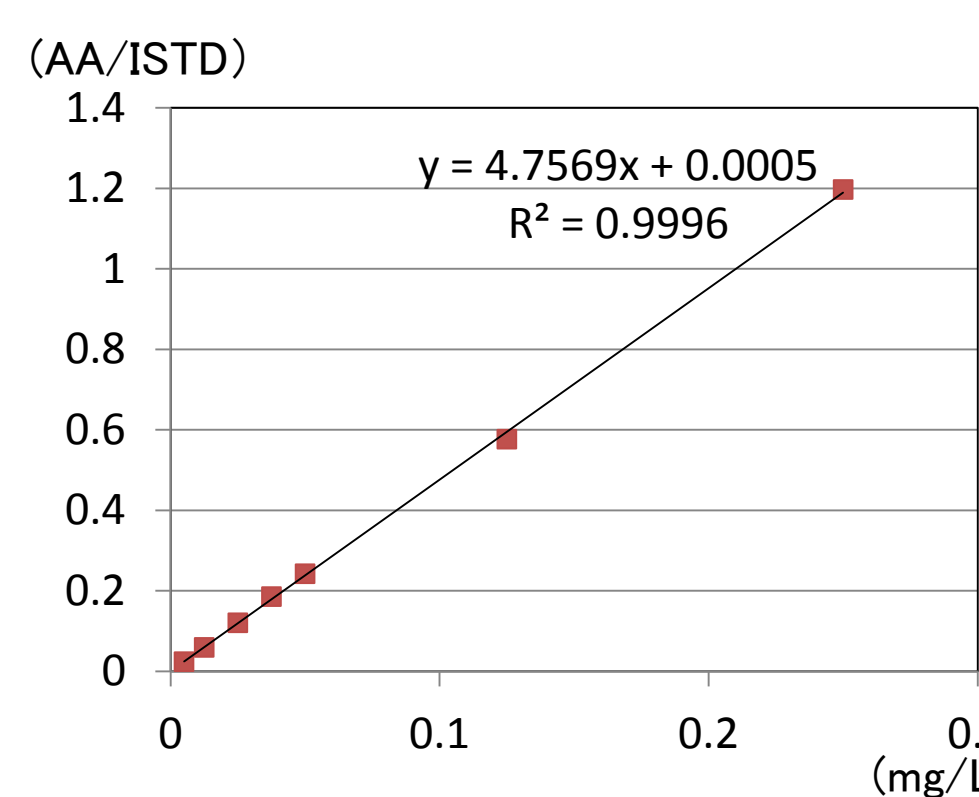


Fig.5 検量線 0.005~0.250mg/L

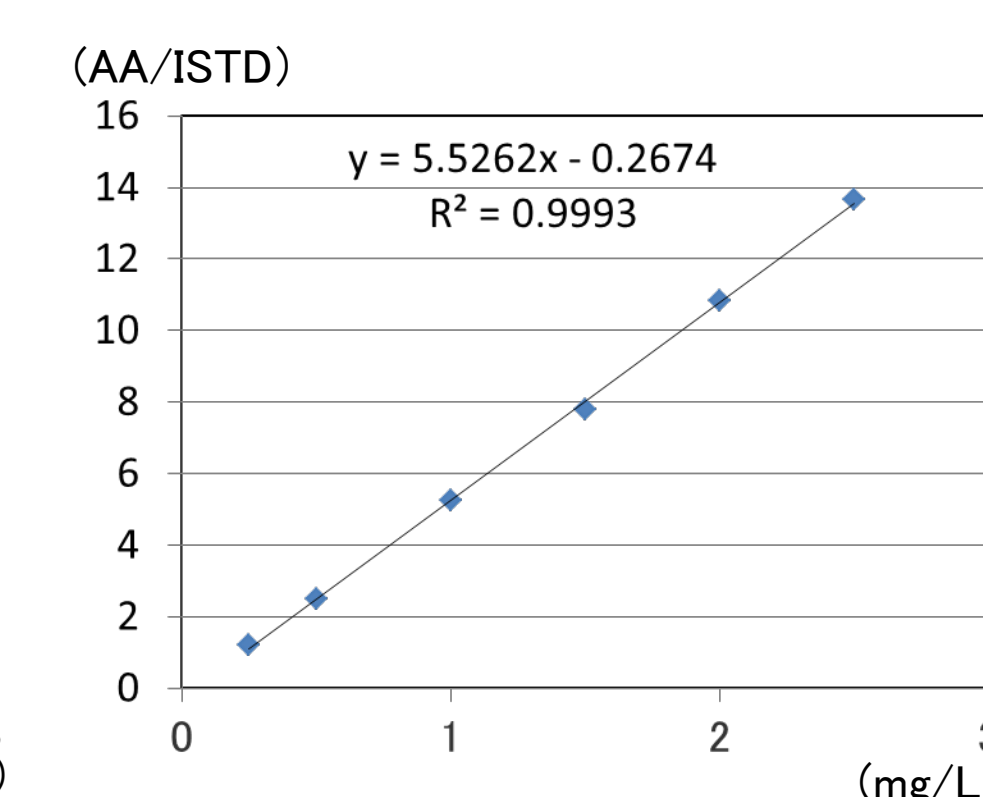


Fig.6 検量線 0.25~2.5mg/L

3.2 検出限界及び定量下限

低濃度のアクリルアミドを含む試料に、0.04mg/kgになるように添加した試験溶液を20回測定し、その濃度の標準偏差からアクリルアミドの検出限界及び定量下限を求めた。
得られた測定値から試料中濃度に換算した後、その標準偏差を算出し、これらに3.29及び10を乗じた値を、それぞれの試料の検出限界及び定量下限とした。ポテトスナックにおけるアクリルアミドの検出限界は、0.004mg/kg、定量下限は、0.01mg/kg、ビスケットでは検出限界が0.003mg/kg、定量下限は、0.01mg/kgであった。(Table.2)

Table.2 検出限界及び定量下限

マトリックス	添加濃度 (mg/kg)	検出限界 (mg/kg)	定量下限 (mg/kg)
ポテトスナック	0.04	0.004	0.01
ビスケット	0.04	0.003	0.01

3.3 添加回収試験

高濃度区: 0.1mg/kg、低濃度区: 0.01mg/kgとして、2点併行で5回(日を変えて)の添加回収試験を行った。ポテトスナック、ビスケットともに基材にアクリルアミドが含まれるため、これを測定値から差し引いた後に回収率を算出した。ポテトスナックでの平均回収率は、高濃度区で95.3%、低濃度区で100.9%、ビスケットでの平均回収率は高濃度区で90.4%、低濃度区で101.5%、と良好な結果が得られ、高濃度区、低濃度区と共に、該当する濃度でのCodexの基準*(80~110%)を満たしており、真度に問題はなかった。(Table.3)

*) Codex Alimentarius "Residues of Veterinary Drugs in Foods" 2nd ed. (1993)

Table.3 添加回収試験結果

マトリックス	ポテトスナック		ビスケット	
添加濃度(mg/kg)	0.1	0.01	0.1	0.01
平均回収率 (%)	95.3	100.9	90.4	101.5
RSD (%)	4.1	4.2	6.8	9.8
併行精度(RSDr)	0.9	2.4	3.5	3.1
室内精度(RSDi)	6.5	6.1	11.1	14.4

添加回収試験の基材とした試料のクロマトグラムをFig.7に示した。

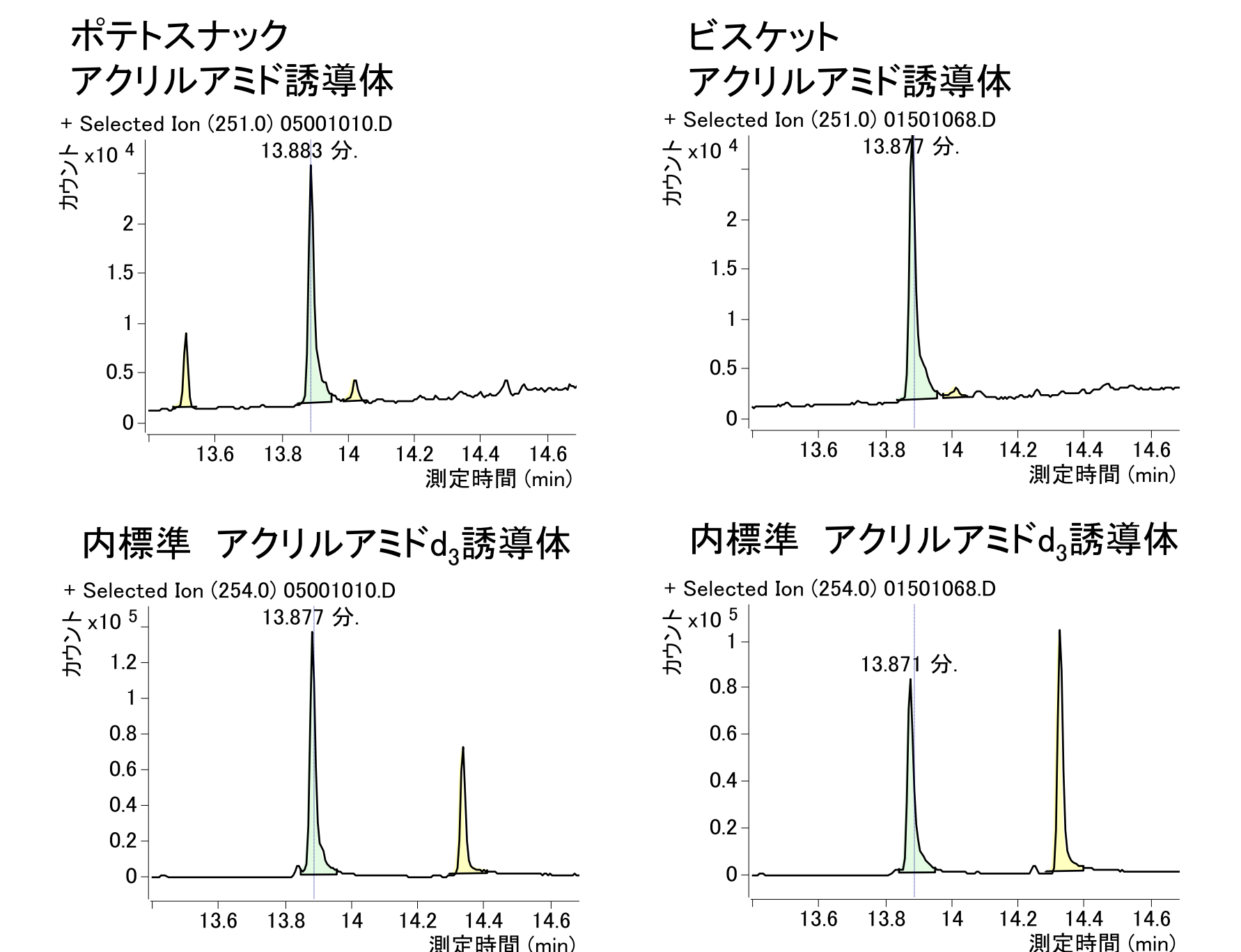


Fig.7 アクリルアミド及びd₃誘導体のクロマトグラム