

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

加工食品中のアクリルアミドの測定・分析及び

リスク評価等に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）年4月

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部長 米谷 民雄

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・病理部長 広瀬 雅雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・毒性部長 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・変異遺伝部長

林 眞

国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長 奥田 晴宏

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- 加工食品中のアクリルアミドの測定・分析及びリスク評価等に関する研究 …………… 1  
米谷 民雄

## II. 分担研究報告書

1. 食品中アクリルアミドの含有量及び調理加工による増減に関する研究 …………… 7  
米谷 民雄
2. リスクコミュニケーションに関する研究 …………… 23  
井上 達
3. アクリルアミドによる毒性影響の抑制に関する実験的研究 …………… 27  
広瀬 雅雄
4. 加工食品中のアクリルアミドの毒性評価に関する研究 …………… 35  
菅野 純
5. アクリルアミドの遺伝毒性に関する文献的調査 …………… 51  
林 眞
6. 加工食品中でのアクリルアミドの生成機序に関する研究 …………… 59  
奥田 晴宏

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 71

# I. 総括研究報告書

加工食品中のアクリルアミドの測定・分析  
及びリスク評価等に関する研究

主任研究者 米谷 民雄

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
総括研究報告書

加工食品中のアクリルアミドの測定・分析及びリスク評価等に関する研究

主任研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

食品中のアクリルアミド (AA) 問題に対応すべく、本特別研究が実施された。本研究では、①分析法として GC/MS 及び LC/MS を用いる方法を確立し、それを用いて市販食品 179 試料を分析した結果、ポテトチップス等のスナック等から、最高 3544 ng/g の AA を検出した。加えて、調理加工条件が AA 生成に及ぼす影響についても検討した。また、② AA 生成機序に関する文献調査をした結果、AA はアスパラギンと還元糖が関与する高温でのメイラード反応により高率で生成することを、複数の研究グループが報告していたが、AA 生成制御に関する具体的な方策については研究開発途上であった。③ AA のリスク評価のために、これまで報告されている内外の毒性情報（一般毒性、生殖発生毒性、代謝、神経毒性、発がん性等）及び最新の知見を収集し、取りまとめを行った。④ AA の遺伝毒性に関する公表文献を調べたところ、非常に多くの試験がなされており、原核生物を用いる試験系はほとんど陰性であったが、真核生物を用いる試験系においては種を超え、*in vitro*、*in vivo* に関わらず陽性の結果であった。特筆すべきは、優性致死試験結果をはじめ、生殖細胞に対して染色体異常誘発性を示していることであり、がん原性と共に後世代への影響に関しても注意が必要と考えられた。⑤ AA の神経毒性を抑制する物質を検索する目的で、AA の解毒抱合体の基質となる N-acetylcystein(NAC)、解毒酵素誘導剤である phenethyl isothiocyanate(PEITC)、抗酸化剤の 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone(HTHQ)を候補化合物として、SD 系雄ラットに AA と共に投与する実験を行った。さらに、⑥ AA への曝露の日常性に鑑みて、リスクコミュニケーションの方途についても検討を行った。

分担研究者

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター長  
広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・病理部長  
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・毒性部長  
林 眞 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・変異遺伝部  
長  
奥田 晴宏 国立医薬品食品衛生研究所・  
有機化学部長

A. 研究目的

平成 14 年 4 月末に、スウェーデンの研究  
者が、ポテトチップス等の加工食品中に  
「ヒトでおそらく発がん性」と分類されて  
いるアクリルアミド (AA) が含まれている  
と発表した。この問題に対応すべく、本特  
別研究班が編成された。本研究では、① AA  
の GC/MS 及び LC/MS による分析法を確  
立し、それらの方法を用いてわが国におけ  
る加工食品中の AA 含有量の実態調査を行  
うとともに、調理加工条件が AA 生成に及  
ぼす影響について検討した。また、②食品

中 AA の生成機序に関する文献調査を行い、並びに、リスク評価のために、③AA の一般毒性に関する文献調査、及び、④変異原性に関する文献調査を実施した。さらに、⑤AA の神経毒性を抑制する物質を検索する目的で、候補化合物を用いた動物実験を行った。なお、⑥食品中に見いだされた AA に想定される生体障害については、AA への曝露の日常性に鑑みて、一般社会のこのものに対する認知、理解が必要であることから、この面からの、リスクコミュニケーションの方途についても検討を行った。

## B. 研究方法

①AA の安定同位体を手し、GC/MS 及び LC/MS による食品中 AA の分析法の開発を行った。主として、開発した LC/MS 法を用いて、各種食品 179 試料につき、AA 含有量の実態調査を行った。さらに、モデル試料、農産物粉体及び生鮮農産物を用いて、加熱調理による AA 生成について、加熱温度等の因子の影響について検討した。

②データベースとして PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) 及び Chemical Abstract 並びにインターネット上で検索エンジン Google を用い、食品中の AA の生成機構及びその制御に関する論文等を収集し、AA の生成機序及びその制御に関して考察した。

③最近の国際機関や各国政府機関で行われていた AA の健康リスク評価報告書並びに直近の論文までを収集し、AA の毒性研究の現状について調査した。

④AA の遺伝毒性試験に関する学術論文を Medline により検索し、収集した。また、IARC、USNTP データベース、Toxline も利用してその遺伝毒性に関する情報を収集した。収集した学術論文、他の情報をレビューし、現時点における AA の遺伝毒性の評価を行った。

⑤6 週齢の雄 SD:IGS ラットに、AA 200ppm (飲水投与) と、N-acetylcystein (NAC, 10000ppm)、2-phenethyl isothiocyanate (PEITC, 500 ppm)、1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ, 1000ppm) をそれぞれ単独あるいは AA との併用で 28 日間投与した。投与期間中、神経症状(Gait score)を週 1 回モニターした。実験終了時に、各群 8 例を剖検し、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、脳 (小脳と延髄を含む)、頸髄、末梢神経を採取し、肝臓、腎臓、精巣については重量を測定した。臓器を固定後、HE 染色を行った。また、無処置対照 3 例と AA を投与した全群の各 5 例につき灌流固定を行い、頸髄と末梢神経をエボン包埋し、トルイジンブルー染色を行った。

⑥①から⑤の結果を統合して得られる情報をもとに、対応したリスクマネジメントの方策などを導き出し、必要なリスクコミュニケーションの展望を明らかにした。  
(倫理面の配慮)

⑤の動物実験では、エーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血により屠殺することにより、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

その他の分担研究項目は、食品材料を用いた化学的実験か、公開されている文献情報に基づく科学的事項に関する調査研究であり、倫理面に配慮すべき事項はない。

## C. 研究結果

①食品中の AA 分析法として、安定同位体を内標準として用い、臭素誘導体化後 GC/MS で測定する方法、及び誘導体化せずにカラムスイッチングを使用した LC/MS で測定する方法を、それぞれ確立することができた。検出限界はいずれも 9

ng/g であった。

市販食品中の AA を測定した結果、スナック、菓子、ナッツ、ほうじ茶、麦茶などの加工食品から最高 3544 ng/g の AA を検出した。水分含量が高い植物性食品及び魚、卵、肉製品の AA 濃度は低かった。

アスパラギンを加えたデンプンを 140℃ 以上に加熱すると AA が生成した。これに還元糖を添加すると生成が促進された。乾燥マッシュポテトでは加熱により、小麦粉、コーンミール、上新粉及び白玉粉に比べ高濃度の AA が生成した。また、もやし、じゃがいも、アスパラガス、かぼちゃなどの生鮮農産物を 220℃ で加熱すると AA が生成した。これらの野菜を茹でた後に加熱すると AA 生成量は減少した。

②加熱調理食品中の AA は主に食品中のアスパラギンと糖とのメイラード反応に起因することを、2002 年にカナダ政府グループを始め 3 つの研究者グループらがそれぞれ独自に明らかにしている。

メイラード反応は還元糖とアミノ酸、タンパク質との反応により最終的に褐色物質を生成する反応であり、食品の着色着香に関与する反応として古くから知られた反応である。現時点では AA 生成に関与する最も重要な因子は、加熱温度及び加熱時間であり、例えば 170-185℃、10-20 分程度の処理で AA が高率に生成することが明らかにされている。AA の生成抑制に関する研究や調理現場で実行可能な具体的抑制方法は、研究開発途上である。

③AA のトキシコキネティクス、急性毒性、長期毒性、発癌性、神経毒性、生殖毒性、発生毒性、疫学及びそれらの毒性について、現在までに考えられている作用機序についてまとめた。重要な毒性として、発癌性、神経毒性、生殖発生毒性があるが、最も低用量で毒性が認められるのは神経毒性であった。AA の発癌性や精巣毒性の発

現機構機構として AA あるいはその代謝物のグリシダミドと DNA あるいは蛋白との付加体形成が関与していることが示唆されている。

④バクテリアを用いた遺伝子突然変異試験（エームス試験）ではすべて陰性を示したのに対して、真核生物を用いたほとんどの試験系では *in vitro*、*in vivo* 試験とも陽性結果が得られている。特に、染色体異常誘発性、DNA 損傷性が明らかであることから、AA は染色体異常誘発物質と言える。特筆すべき点としては、優性致死試験結果をはじめ、生殖細胞に対する染色体異常誘発性が示されていることであり、がん原性と共に後世代への遺伝的影響についても注意が必要である。

⑤Gait score は、投与 3 週目まで AA 投与各群の間で明らかな差は認めなかったが、AA+HTHQ 群でスコアの低値傾向を認め、4 週目ではこの群で対照群に比べ明らかな低値を示した。病理組織学的検索の結果、AA 投与各群で末梢神経の軸索、脊髄背索の変性、三叉神経のニューロンの色質融解を認めたものの、その程度に群間に明らかな差は認められなかった。精巣では AA 投与各群で精細管の精上皮細胞の脱落ない residual body 様の構造が管腔内に認められ、その程度は、AA 単独に比べ、AA+PEITC と AA+HTHQ 投与群で明らかに弱かった。また、精巣上体では AA 投与各群で細胞残屑が認められたが、その程度は AA 単独に比べ、AA+PEITC 投与群で明らかに弱かった。

⑥上記の分担研究者の研究成果を総合すると、調査の結果からは、AA はアスパラギンと還元糖が関与する高温でのメイラード反応により高率で生成することが明らかになっており、毒性発現の面からは、毒性発現は、親化合物そのものと、薬物代謝酵素 CYP2E1 による代謝物のグリシダミド

によって惹起され、皮膚・眼粘膜の刺激性、末梢神経の変性を伴う神経毒性の他、精巢毒性が指摘されている。また遺伝毒性試験で無閾値性の発がん性リスクが認められ、これに対応して齧歯類を用いた発がん性試験で1~2mg/kg 体重/日程度の投与量で腫瘍発生の増加が観察されている。

#### D. 考察

①食品中のAA分析には、スウェーデンが最初に報告したLC/MS/MSのみならず、GC/MSまたはLC/MSでも対応出来ることが立証できたことは、実態調査等に役立つと考えられる。

食品中のAAは国内を含め世界各地で分析されており、本研究で得られた結果はそれらの分析結果と同レベルであった。また、日本固有の食品で特に高濃度に含まれているものはなかったことから、日本人のAA摂取量が世界的に見て特に高くはないと推定される。実態調査では高温で加熱された植物性食品から高濃度に検出され、加熱実験では特にアスパラギン含量が高いじゃがいも、アスパラガス、もやしなどでAA生成量が多かったことは、現在までに報告されているAAの生成機構（アスパラギンと還元糖が高温で加熱されると反応してAAが生成する）を裏付けるものであろう。

②AAの生成機構研究開始当初は、脂質中のトリグリセリド等からアクロレインあるいはアクリル酸が中間体として生成し、さらにアンモニアと反応してAAが生成する機構も想定された。しかし、この経路の関与はないかあっても極めて小さいことがその後のアスパラギンを用いた研究から考えられるに至った。AAの生成機構が明らかになったことから、AAの生成を抑制するためには、加熱温度や時間を検討する、炭水化合物やアスパラギンを除去する、あるいは適当な添加物を用いるなどの方策が

考えられているが、現時点では研究室レベルの報告にとどまっている。メイラード反応を修飾する因子は様々あげられているが、得られている知見を実際の食品に応用しAAを減少させるためには、食品ごとの個別的研究が重要であると考えられる。

③AAの毒性に関しては既に膨大なデータがある。発癌性に関しては、ラットで陰嚢、甲状腺、副腎、乳腺、中枢神経、甲状腺、子宮等の種々の臓器に腫瘍が、マウスで肺腫瘍が報告されている。一方、今までのヒトでの疫学調査でAAとヒトの発癌を示すデータは報告されておらず、また、スウェーデンでの最近の疫学調査からヒトでのAA摂取量と大腸癌、膀胱癌、腎臓癌の発生率の間に相関は無いことが報告されている。よって、日常摂取レベルでのAAがヒトへの発癌を誘導する可能性は高くはないことが示唆されるが、結論づけるには、上記の追加的毒性データの吟味と、詳細な暴露量を踏まえた上での疫学データが必要である。

④AAはin vitro、in vivoとも遺伝毒性を示すが、その内容は点突然変異のような小さな遺伝子損傷ではなく、DNAの欠失や転座を伴う比較的大きな染色体レベルの損傷が主であると考えられる。一方、組換え型の突然変異は誘発されなかった。これらの結果から単純に考えると、AAによる遺伝毒性は放射線等によってもたらされるDNAの2本鎖切断に由来する遺伝子損傷と極めて類似している。詳細な遺伝子損傷のメカニズムに関しては変異体の分子生物学的解析を必要とするが、AAの遺伝毒性の特徴としてはこのようなradiomimicな染色体異常誘発性が考えられる。

⑤神経障害に関しては、Gait scoreではHTHQが部分的に神経症状を改善したものの、病理組織学的検索では、抑制効果は明らかではなかった。AAによる神経障害

は、AA のモノマーが直接神経細胞に作用して毒性を及ぼすという仮説が提示されているが、抗酸化物質投与により、神経症状が部分的に改善されるという報告もある。一方、AA による精巣障害に対しては、PEITC 及び HTHQ が部分的に障害を抑制する事が明らかとなり、これらの化学物質が、代謝活性化あるいは解毒酵素の誘導に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

⑥以上により、AA は加熱調理により生成することが推察され、不作為的に必然的なリスクと考えられた。そこで、このもののリスク管理としては、発がんリスクの強さからみたリスクの周知、商品におけるリスク逡減化の方策の検討と共に、食生活の改善面からの 対応などが考えられた。

#### E. 結論

①GC/MS 及び LC/MS を用いて食品中の AA 含有量を調査した結果、AA 含有量が高い食品は高温で加熱加工され、且つ水分が少ない植物性食品であった。実態調査及びモデル試料等の加熱実験の結果から、AA 生成を抑制するためには、植物性食品の製造方法、特に加熱温度と加熱時間を見直す必要がある。また、AA 前駆体成分は農産物の種類及び個体による差が大きいことから、食材の選択、加熱前の前処理によって前駆体を減らし、生成を抑えることも必要である。生鮮野菜を加熱した場合も AA が生成することから、家庭における調理も含めて、食材の過度な加熱は避けることが賢明であろう。なお、AA のリスクを評価する上では、加熱実験において一旦生成した AA が減少する反応機構を明らかにする必要がある。

②AA の生成はアスパラギンが関与するメイラード反応に起因することがモデル反応等の検討により明らかとなった。現時点

では、AA の生成を抑制する有効な具体的な方策は研究開発途上である。

③1) AA の重要な毒性として、発癌性、神経毒性、生殖発生毒性があるが、最も低用量で毒性が認められるのは神経毒性である。2) AA の発癌性や精巣毒性の発現機構として AA あるいはその代謝物のグリシダミドと DNA あるいは蛋白との付加体形成が関与することが示唆されている。3) 現時点で、ヒトへの発癌性を示す疫学的データは報告されていない。

④AA はエームス試験ではすべての菌株で陰性を示したのに対して、真核生物を用いたほとんどの試験系では *in vitro*、*in vivo* 試験とも陽性結果が得られている。特に、染色体異常誘発性、DNA 損傷性が明らかであることから AA は染色体異常誘発物質(Clastogen)と言える。特筆すべき点としては、優性致死試験結果をはじめ、生殖細胞に対する染色体異常誘発性が示されていることであり、がん原性と共に後世代への遺伝的影響に関しても注意が必要であろう。AA は明らかに遺伝毒性を示すことから、今後そのメカニズムの解明や、ヒトに対する正しいリスク評価が必要である。

⑤AA による神経障害に関しては、Gait score では HTHQ が部分的に神経症状を改善したものの、病理組織学的検索では、抑制効果は明らかではなかった。一方、精巣障害に対しては、PEITC、HTHQ が部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。

⑥AA に想定される生体障害については、その曝露の日常性に鑑みて、曝露の完全回避には困難があり、従って、1) 実効的な安全域の面からの沈着な理解と、2) がん抑制効果の期待される食品の研究と相俟っての食生活そのものの改善への注意喚起の、二面から考えることが重要である。

#### F. 健康危機情報



AAに関する情報は、上記の通りである。  
AAの生体影響に関するリスクコミュニケーションについては、研究の位置づけと成果を、積極的にホームページなどを中心にして、社会に発信してゆくことが必要であろう。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1) Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K., Maitani, T., Determination of acrylamide in foods by GC/MS using <sup>13</sup>C-labeled acrylamide as an internal standard. J. Food Hyg. Soc. Japan, 43, 371-376 (2002).

2) Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., Maitani, T., Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching. J. Food Hyg. Soc. Japan, 44, 89-95 (2003).

3) 米谷民雄, 食品中のアクリルアミド, 食品衛生学雑誌 43, J348-J351 (2002).

4) 米谷民雄, アクリルアミド, からだの科学 230, 113 (2003).

##### 学会発表

1) Inoue T. Key Note Lecture: Risk management in drug and food safety: Future prospect of toxicology and risk management. International Joint Conference of Risk-management for Preventive Medicine. Nat'l Inst Infect Disease, Shinjuku, Tokyo, March 28, 2003.

2) 佐々木久美子, 高附 巧, 根本 了, 米谷民雄: 食品中のアクリルアミド, 日本薬学会第123年会(長崎, 2003年3月)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

## Ⅱ. 分担研究報告書

### 1. 食品中アクリルアミドの含有量

及び調理加工による増減に関する研究

分担研究者      米谷 民雄

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
分担研究報告書

食品中アクリルアミドの含有量及び調理加工による増減に関する研究

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

ポテトチップス、フライドポテト、ビスケットやシリアルのような高温で調理する加工食品中から、神経毒性を有し、発ガン性の疑いがあるアクリルアミド(AA)が高濃度で検出されたと2002年4月にスウェーデンの研究者より発表があった<sup>1)</sup>。これまで食品中のAA分析法はほとんど研究されていなかったことから、食品中のAA分析法を確立し、国内の各種食品のAA含有量実態調査を行う(第1部)とともに、調理加工によるAA生成について研究を行った(第2部)。

食品中のAA分析法として、臭素誘導体化後、GC/MSで測定する方法及びカラムスイッチングを使用したLC/MSで測定する方法をそれぞれ確立した。

GC/MSによる方法では、試料に内標準として<sup>13</sup>C標識したAA(AA-1-<sup>13</sup>C)を添加して水抽出し、酸性条件下臭化カリウム-臭素酸カリウムで臭素化し、生じた2,3-ジブromopropionアミドをトリエチルアミンで脱臭化水素して2-ブromopropenアミドとした後、GC/MS(SIM)で定量した。本法による回収率は平均97~105%、相対標準偏差0.8~3.9%、検出限界は9 ng/gであった。

LC/MSによる方法では、試料に内標準としてAA-1-<sup>13</sup>Cを添加し、AAをアセトノー水混液で抽出し、ジクロロメタン洗浄及び3種のカートリッジカラムで精製した後、LC/MSで測定した。測定には4種のカラムをスイッチングして使用し、AAをm/z 72で定量し、m/z 55で確認した。本法の回収率は99.5~101.0%、標準偏差0.3~1.6%、検出限界は9 ng/gであった。

各種加工食品中のAAを測定した結果、ポテトチップスをはじめとする各種スナック、菓子類、ナッツ類、ほうじ茶、麦茶などから最高3544 ng/gのAAを検出した。これら植物性食品に比べ、魚、卵、肉製品のAA濃度は低かった。また、水分含量の低い食品に比べて水分含量が高い食品のAA濃度は低かった。

調理加工によりAAが生成されていることから、モデル試料、各種加工食品原料となる農産物粉体試料及び生鮮農産物の加熱を行い、AAの生成について検討した。その結果、モデル実験ではアスパラギンを加えたデンプンを140℃以上に加熱することによりAAが生成した。また、還元糖添加の有無及びデンプン分子の構造等によりAA生成の速度及び量に差がみられた。

乾燥マッシュポテトを粉体のままあるいは水を加えてチップ状に成型して加熱した時、試料形状によらず180℃付近で5から10分間の加熱で最も多くのAAが生成した。また、小麦粉、コーンミール、上新粉及び白玉粉は試料形状によりAAの生成状態が変化した。

生鮮農産物を220℃で加熱すると、もやし、じゃがいも、アスパラガス、かぼちゃ及びびなすなどからAAが生成した。電子レンジで前処理を行った後、同じ条件で加熱すると生成したAAはより高い値を示した。また、茹でた後に加熱するとAAの生成量が減少した。

研究協力者

佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所  
根本 了 国立医薬品食品衛生研究所  
高附 巧 国立医薬品食品衛生研究所

はじめに

本研究では、食品中のアクリルアミド(AA)分析法を確立し、国内の各種食品のAA含有量実態調査を行うとともに、調理加工によるAA生成について研究を行った。それぞれについて第

1部, 第2部で報告する.

## 第1部 各種食品中のAA分析法の確立と実態調査

### A. 研究目的

アクリルアミド(AA)がポテトチップス, フライドポテト, ビスケットやシリアルのような高温で調理する加工食品中から高濃度で検出されたことが2002年4月にスウェーデンの研究者より発表された<sup>1)</sup>. その後, 2002年6月にFAO/WHO主催の国際専門家会議が行われ, ノルウェー, スイス, 英国及び米国からも加工食品中からAAが検出されたと報告された. AAは神経毒性を有し, ヒトに対する発ガン性の疑いがある化学物質であるが, これまで食品中から高濃度のAAが検出されたという報告はなかった. そのため, 食品中AA摂取によるヒトへの健康影響や一日摂取量などについてはまだ明らかにされていない.

AAは, 浄水処理に凝集剤として使用されるポリアクリルアミド中にモノマーとして微量含まれていることから, 国際的にも水質基準が設定されている. そのため水試料や底質については分析法の報告例が多い<sup>2), 3), 4)</sup>. 食品中AAの分析については報告例が少ないが, 主として臭素誘導体化によるGC-ECD<sup>5), 6)</sup>, GC/MS<sup>7)~9)</sup>, HPLC<sup>10)</sup>, LC/MS<sup>11)</sup>による方法が報告されている.

そこで, これらの方法を参考に先ず臭素誘導体化したAAをGC/MSを用いて分析する方法を確立し, 各種食品31試料について実態調査を行った.

しかし, 誘導体化による分析法は煩雑であるので, 誘導体化せずに測定できればより速い分析が可能となる. 低濃度のAAを誘導体化なしに直接測定したのはスウェーデンのLC/MS/MSによる方法が初めてであった<sup>12), 13)</sup>. また, 誘導体化なしでAAをLC/MSで分析したのは学会での報告<sup>14)</sup>を除いてみられない.

そこで本研究では, さらにLC/MSを用いた各種食品中のAA分析法を確立し, 日本国内で流通している各種食品, 179試料の実態調査を行った.

### B. 研究方法

#### I. GC/MSによる分析

##### 1. 試料

添加回収実験及び実態調査には, 2002年5月から7月に東京都世田谷区内で購入した市販食品を使用した. 固形試料については粉碎し均一化したのち, 粉末試料についてはそのまま, 分析まで-30°Cで保存した.

##### 2. 試薬・試液

標準品: AA(純度99.9%)は関東化学(株)製の電気泳動用を使用した. アクリルアミド-1-<sup>13</sup>C(99 atom%<sup>13</sup>C, 以下AA-1-<sup>13</sup>Cと略)はCDN ISOTOPES社製を使用した.

標準原液: 各標準品10 mgを正確に10 mLの褐色メスフラスコに採り, 蒸留水を加えて全量を10 mLとし1000 μg/mLの標準原液とした. 本溶液は褐色の共栓付ガラス容器に入れ, 冷蔵庫(4°C)に保存した.

標準溶液: 各標準原液を蒸留水で適宜希釈して標準溶液とした.

臭化カリウム, トリエチルアミン及び硫酸: 和光純薬工業(株)製の特級試薬

0.1 mol/L臭素酸カリウム溶液: 臭素酸カリウム(和光純薬工業(株)製特級試薬)1.67 gを蒸留水に溶解して100 mLとした.

1 mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液: チオ硫酸ナトリウム五水和物(和光純薬工業(株)製特級試薬)24.82 gを蒸留水に溶解して100 mLとした.

フロリジルカートリッジカラム: Waters社製 Sep-Pak Plus Florisilを使用した.

n-ヘキサン(ヘキサン), 酢酸エチル, アセトン及び無水硫酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製又は関東化学(株)製の残留農薬試験用試薬を使用した.

蒸留水: イオン交換水をガラス製の蒸留装置を用いて2回蒸留したものをを使用した.

##### 3. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計: Hewlett Packard (HP)社製ガスクロマトグラフHP5890 S

eries II (同社製オートサンプラーHP7673付) 及び質量分析計HP5972 MSD

ホモジナイザー:ポリロン(KINEMATICA A G社製)

遠心濃縮機:スピードバックESC-2000(サーバント社製)

#### 4. GC/MS測定条件

カラム:DB-WAX(内径0.25 mm,長さ30 m,膜厚0.25  $\mu$ m, J & W Scientific社製)にガードカラムとして不活性化キャピラリーカラム(内径0.25 mm,長さ2 m, J & W Scientific社製)を接続した。

オープン温度:50°C(1 min)→15°C/min→240°C(11.3 min)

注入口温度:250°C

トランスファーライン温度:240°C

イオン化電圧:70 eV(EIモード)

測定モード:選択イオン検出(SIM)及びSCAN

SIM条件:モニターイオン(下線が定量用,他は定性用)

2-ブロモプロペンアミド(2-BPA): $m/z$

149, 151, 108, 106, 70

2-BPA-<sup>13</sup>C(AA-1-<sup>13</sup>Cの臭素化体): $m/z$

150, 152, 108, 106, 71

SCAN条件:スキャン範囲50~550 amu, スキャンスピード1.5 scans/sec

EM電圧:SIM測定では2800 V, SCAN測定ではオートチューニングでの設定値を用いた。

キャリアーガス:ヘリウム(1 mL/minで定流量モード)

注入量:2  $\mu$ L(スプリットレス)

#### 5. 試験溶液調製法

試料2.0 gを250 mLの遠沈管にとり,内標準として100  $\mu$ g/mL AA-1-<sup>13</sup>C溶液20  $\mu$ Lを添加した。蒸留水40 mLを加え,2分間ホモジナイズ抽出し,2600 rpmで10分間遠心分離した。上澄み液を50 mLの共栓付メスシリンダーに移し,蒸留水で40 mLとし,このうち20 mL(試料1.0 g相当)を50 mLの共栓付遠沈管にとり,ヘキサン10 mLずつで2回5分間振とう洗浄を行っ

た(エマルジョンが生じた場合には3000 rpmで5分間遠心分離した)。

5 mol/L硫酸を用いてpH 1以下とし,臭化カリウム10 gを加えて完全に溶解したのち,0.1 mol/L臭素酸カリウム溶液6 mLを加えよく混合してから冷蔵庫(庫内温度4~10°C)中で90分間静置した。臭素化後の溶液に1 mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液を臭素の黄褐色が消失するまで加え,過剰の臭素を分解したのち,酢酸エチル10 mLずつで2回5分間振とう抽出した(エマルジョンが生じた場合には3000 rpmで5分間遠心分離した)。抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水し,ロータリーエバポレーターを用いて酢酸エチルを留去した。

残留物を10%アセトン含有ヘキサン(10% A/H)約2 mLで溶解し,予めヘキサン10 mLで洗浄したフロリジルカートリッジカラムに負荷した。濃縮容器は10% A/H 1 mLずつで2回洗い,洗液をカラムに負荷した。カラムを10% A/H 6 mLで洗浄したのち,20% A/H 15 mLで被検物質を溶出し,溶出液を試験管で集めた。溶出液を遠心濃縮機を用いて濃縮後,窒素を吹きつけて溶媒を留去し,残留物にアセトン0.5 mLを加えたのち,トリエチルアミン20  $\mu$ Lを添加して脱臭化水素し,試験溶液とした。

#### 6. 検量線の作成

AA標準溶液をAA無添加及び5~2000 ngになるように段階的に50 mLの共栓付遠沈管にとり,次に内標準として100  $\mu$ g/mL AA-1-<sup>13</sup>C溶液10  $\mu$ Lを添加し,蒸留水で20 mL定容とした。調製した検量線用標準溶液について,ヘキサンによる洗浄を除き,5. 試験溶液調製法の項の臭素化反応と同様に操作して,検量線用試験溶液を調製した。

#### 7. 定量及び確認

定量はGC/MS(SIM)測定により,内標準の2-BPA-<sup>13</sup>Cに対する2-BPAのピーク面積比を求めて内標準法により行った。確認はSCAN測定ではマススペクトルを, SIM測定では定性用イオンの相対強度比を,標準品と比較することにより

行った。

## II. LC/MSによる分析

### 1. 試料

添加回収実験及び実態調査用の試料として2002年5月から2003年2月に東京都世田谷区内の店舗より購入した食品試料（固体試料169種，液体試料10種）を用いた。

固体試料は粉碎した後，分析まで-30℃で保存した。フライドポテト，オムレツ，魚フライ及び肉の揚げ物等の惣菜試料については，購入後，直ちに分析を行った。天ぷら，魚フライ及びコロケはコロモのみを分析した。メンチカツ及びアジフライについては全体及びコロモの両方について分析を行った。

### 2. 試薬・試液

標準品：I. 2を参照

溶媒：蒸留水（高速液体クロマトグラフィー用，関東化学株又は片山化学株製），メタノール（高速液体クロマトグラフィー用，メルク・ジャパン株製），アセトン（残留農薬試験・PCB試験用，関東化学株製），ジクロロメタン（高速液体クロマトグラフィー用，関東化学株製）を用いた。

標準原液（100  $\mu$ g/mL）：100 mLのメスフラスコにAA及びAA-1-<sup>13</sup>C各10 mgを秤り取り，蒸留水に溶解し，100 mLとし，4℃で保存した。

検量線用標準溶液：AAが50，100，500，1000，2000及び5000ngとなるようにAAの標準原液をとり，AA-1-<sup>13</sup>C標準原液20  $\mu$ L（2000 ng）を加え，蒸留水で10 mLとし，4℃で保存した。

その他試薬等：酢酸（精密分析用，片山化学株製）を使用した。

カートリッジカラム：Bond Elut C18（500 mg/3 mL），Bond Elut Jr. PSA（500 mg），Bond Elut ACCUCAT（600 mg/3 mL）Varian社製を使用した。C18及びACCUCATカラムはいずれもメタノール2 mL次いで蒸留水4 mLでコンディショニングし，PSAカラムは蒸留水4 mLでコンディショニングした後使用した。

### 3. 装置

LC/MS：Separation module model 2690液体クロマトグラフ（Waters社製）及びPlatform LCZ質量分析計（Micromass社製）

ポンプ：LC-10AD及びLC-10AD VP（島津製作所株製）

脱気装置：ERC-3215  $\alpha$ （ERC社製）

自動6方切換バルブ：LabPRO（レオダイン社製）及びEV700-100（GLサイエンス株製）

ホモジナイザー：ポリトン（KINEMATICA AG社製）

濃縮装置：Turbo Vap 500（Zymark社製）

### 4. LC/MS測定条件

カラム：カラム1，Hypercarb（ID. 2.1  $\times$  50 mm，5  $\mu$  m，Hypersil-Keystone社製）；カラム2，Shodex MSpak GF-310 4B（ID. 4.6  $\times$  50 mm，6  $\mu$  m，昭和電工株製）；カラム3，Atlantis dC18（ID. 2.1  $\times$  150 mm，5  $\mu$  m，Waters社製）；カラム4，RPAQUEOUS-AR-3（ID. 2.0  $\times$  35 mm，3  $\mu$  m，野村化学株製）

カラムオープン温度：カラム1,2,3は40℃，カラム4は室温

移動相：0.1%酢酸-メタノール（95 : 5）。

流速：0.25 mL/min

カラムスイッチ時間：カラム1からカラム2，1.75~2.05 min；カラム2からカラム3，4.66~5.15 min

ガス：窒素，約300 L/hr

ソースブロック温度：120℃

デソルヴェーション温度：350℃

イオン化モード：大気圧イオン化法（ESI），ポジティブ

測定モード：selected ion recording（SIR）

モニターイオン及びコーン電圧：コーン電圧25V； $m/z$  72（AA）及び  $m/z$  73（AA-1-<sup>13</sup>C），コーン電圧40V； $m/z$  55（AA）及び  $m/z$  56（AA-1-<sup>13</sup>C）

注入量：10  $\mu$ L

### 5. 試料溶液調製法

#### 5. 1. 抽出

固体試料の場合：試料5.0 gを250 mLの遠沈管にとり，内標準溶液100  $\mu$ L（100  $\mu$ g/mL

AA-1-<sup>13</sup>C溶液)及び蒸留水20~25 mLを加え時々振りながら30分間放置した。これにアセトン50 mLを加え、攪拌機で1分間ホモジナイズした。このホモジネートをガラスフィルター(GA-100相当)で濃縮容器に吸引ろ過をし、ガラスフィルター上の残さをアセトン30 mLで洗浄し先のろ液と合わせた。このろ液を15 mL以下になるまで35°Cに設定した濃縮装置で濃縮した。この濃縮液を50 mLの遠沈管に移し、ジクロロメタン20 mLを加え約1分間振りまぜた後、2700 rpmで5分間遠心分離し、ジクロロメタン層を捨てた。これにジクロロメタン20 mLを加え上記と同様に操作し、ジクロロメタン層を捨て、水層を取り蒸留水で15 mLとし抽出溶液とした。

液体試料の場合：試料15.0 gを50 mLの遠沈管にとり、ジクロロメタン20 mLを加え約1分間振りまぜた後、2700 rpmで5分間遠心分離し、ジクロロメタン層を捨てた。これにジクロロメタン20 mLを加え上記と同様に操作し、ジクロロメタン層を捨て、水層を取り水で15 mLとし抽出溶液とした。

## 5. 2. 精製

上記の抽出溶液3 mLをC18カートリッジカラムに負荷し、溶出液を容器に集め、さらに蒸留水2 mLをカートリッジカラムに負荷し、この溶出液を上記の容器に集め蒸留水で5 mLとした。

次に、この溶出液2 mLをACCUCAT及びPSA連結カートリッジカラム(PSAが下)に負荷し、溶出液を容器に集め、さらに蒸留水2 mLをカートリッジカラムに負荷し、この溶出液を上記の容器に集め蒸留水で4 mLとし試験溶液とした。

## 6. AAの検出と定量

AAの検出はLC/MS(SIR)で行った。試験溶液及び検量線溶液について $m/z$  72(AA)と $m/z$  73(AA-1-<sup>13</sup>C)の面積比を求めて、定量を行った。さらに、 $m/z$  55(AA)と $m/z$  56(AA-1-<sup>13</sup>C)の面積比による定量も行い確認を行った。内標準の回収率は試験溶液と標準溶液のAA-1-<sup>13</sup>Cの面積値から求めた。

## C. 結果及び考察

### I. GC/MSによる分析

AAの臭素化法としては、飽和臭素水を用いる方法<sup>2),5),7)~9)</sup>と、臭化カリウム-臭素酸カリウムを用いる方法<sup>3),4),6),10)</sup>が報告されている。前者は臭素そのものを使用するため、ルーチン分析にはやや問題がある。一方、後者では、反応容器内で酸性下、臭化カリウムと臭素酸カリウムから臭素を発生させるため取扱いが容易である。AAを臭化カリウム-臭素酸カリウムを用いて臭素化後、生成した2,3-ジブロモプロピオンアミド(2,3-DBPA)をトリエチルアミンで2-BPAにしてGC分析における安定性を高めてGC測定する方法は、我が国の上水試験方法<sup>15)</sup>で採用されており、今回もこの方法を採用した。しかし、この方法によるAAの臭素化率にはばらつきがあり<sup>15)</sup>、また、AAは農作物とホモジナイズ中に消失することが報告されている<sup>5)</sup>ため、分析精度向上のために、内標準としてAAの安定同位体標識化合物を用いた分析法を作成した。

### 1. 臭素化条件の検討

臭化カリウム-臭素酸カリウムを用いたAAの臭素化条件については、中村<sup>3)</sup>の詳細な報告があり、この臭素化法を行っている従来<sup>3),4),6),10)</sup>や上水試験方法<sup>15)</sup>などでは、すべてその条件を準用している。しかし、これらは試料として主に水が対象であったのに対して、今回対象とするポテトチップスなどの試料は、脂肪やでんぷんなどのマトリックスを多く含み、臭素と反応する不飽和脂肪酸などのアルケン類も多く含むことが予想されたため、改めて臭素化条件について検討した。

その際、臭素化への影響をできるだけ少なくするため、抽出液は臭素化前にヘキサン洗浄による脱脂を行った。また、従来法では検液(抽出液)100 mLを用いて分液ろうとなど大型のガラス器具を多数使用するため、多検体を処理するにはやや効率が悪かった。そのため、小スケール化を図り、抽出液20 mLを用いて、50 mLの共栓付遠沈管のみで臭素化操作を行えるようにした。

検討はヘキサン洗浄後のポテトチップス抽出

液を用いて、中村<sup>3)</sup>の報告を参考にして、①臭化カリウム量、②0.1 mol/L臭素酸カリウム量、③反応時間の3項目について行った。

その結果、抽出液20 mLに対して①臭化カリウム量は10 g(従来法の約1.7倍量)、②0.1 mol/L臭素酸カリウム量は6 mL(従来法の約3倍量)を用いることとした。③反応時間については、冷蔵庫内60分でほぼ一定の収率となったが、できるだけ反応条件を一定にするため90分間静置することとした。

## 2. クリーンアップ法の検討

臭素化後のクリーンアップ法としては、これまでにフロリジル<sup>2)~4),6),15)</sup>、シリカゲル<sup>7),8),10)</sup>、GPC<sup>9)</sup>を用いる方法などが報告されている。この中で報告例が多く上水試験方法でも採用されているフロリジルを用いて検討を行った。しかし、従来の方法では溶出溶媒に有害なベンゼンを使用したり、濃縮に時間のかかるエタノールを使用していたため、溶出溶媒について見直しを行った。また、検討に当たっては、省力化のために既製のカートリッジカラムを使用した。AAを臭素化しその1  $\mu$ g相当量をフロリジルカートリッジカラムに負荷し、溶出パターンを検討したところ、2,3-DBPAは10% A/H 10 mLでは溶出せず、20% A/H 10 mLで定量的に回収された。そのため、カートリッジカラムのロットによる変動を考慮し10% A/H 8 mLで洗浄後、20% A/H 15 mLで溶出することとした。

## 3. 検量線及び検出限界

検量線用試験溶液をGC/MS(SIM)測定し、得られたクロマトグラムピーク面積を用いてAA-1-<sup>13</sup>Cを内標準として検量線を作成した。GCへの注入量として0~8 ng(AA相当量)の範囲で、相関係数  $r = 1.000$ の良好な直線性が得られた。

検出限界(LOD)は、AA無添加の検量線用試験溶液(ブランク, n=8)から得られたピーク面積比の平均値にその標準偏差の3倍を加えた面積比を与える試料中濃度として求めた。同様に定量限界(LOQ)は、ピーク面積比の平均値にその標準偏差の10倍を加えた面積比を与え

る試料中濃度として求めた。その結果、LODは9 ng/g、LOQは30 ng/gであった。実態調査では、LOD以上でLOQ未満の値は痕跡量(tr)とした。

使用したAA-1-<sup>13</sup>Cの<sup>13</sup>C純度は99 atom% <sup>13</sup>Cであるため、2-BPA-<sup>13</sup>Cの定量用イオンのm/z 150より1 amu小さいm/z 149に、相対強度が1%相当の同位体ピークが存在する。従って、LODはこの内標準による干渉により制約される。LODをより低くするためには、内標準の添加量を少なくするか、炭素を3つ<sup>13</sup>Cで標識したAAの安定同位体(AA-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>)を使用する必要がある。今回の検討では、AA-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>は受注生産のため入手に長期間かかることから、入手が可能なAA-1-<sup>13</sup>Cを内標準に用いた。しかし、今回得られたLODはスウェーデン国立食品庁の報告(10 ng/g)<sup>12)</sup>とほぼ同じであり、実態調査を行うには十分な感度が得られた。なお、重水素標識体は臭素化によりH-D交換がおこる可能性があったため使用しなかった。

## 4. 添加回収実験及び分析精度

スウェーデン等での報告を参考にして、AAが検出される可能性があり、主原料がそれぞれ異なるポテトチップス、コーンチップス、プレッツェル及びほうじ茶を用いて添加回収実験を行った結果を表1に示した。また、その時の無添加試料のSIMクロマトグラムを図1に示した。

ポテトチップスでは100 ng/gと1000 ng/gの2濃度について、他の3食品については500 ng/gの添加濃度で実施したが、97~105%の良好な回収率が得られた。回収率の相対標準偏差はいずれも4%未満であり、精度の良い結果が得られた。また、各試料からはいずれもAAが検出されたが、検出値の相対標準偏差は検出値が低かったプレッツェルで8%であった以外は5%未満であり、実試料の測定でも精度の良い結果が得られた。

## 5. 実態調査結果

市販食品31検体の実態調査を行った。表3にLC/MSによる分析値と合わせて結果を示した。



## II. LC/MSによる分析

図2にLC/MS装置構成を示した。

### 1. MS測定条件の検討

AAに対するMSの測定条件を決めるためにコーン電圧を変えて最適化した結果、コーン電圧25Vで $m/z$  72 (M+H) , コーン電圧40Vで $m/z$  55 (M-NH<sub>2</sub>) をそれぞれ定量及び確認用の条件として選択した。

### 2. 抽出条件の検討

AAは水溶性が非常に高いため (2155 g/L, 30℃) ほとんどの場合、試料から水で抽出を行っているが<sup>5),7-9),11)-14)</sup>, AAを水溶液中から有機溶媒で抽出したり固相に吸着させることは困難であるため水で抽出した場合は、抽出後の濃縮が難しい。また、試料を少量の水で抽出した場合、ろ過により試料と抽出液を分けることが難しく、遠心分離によっても完全には分離させることはできなかった。

AAはアセトンにも溶解性が高いのでアセトン抽出を試みたところ、試料に添加したAAはアセトンによる抽出で良好に回収されたが、試料中に含まれているAAは抽出されなかった。そこで、試料を水とアセトンで抽出することによって、水により試料中のAAの抽出率を上げ、アセトンによりろ過の操作をやりやすくし、さらに脱脂操作の前に濃縮してアセトンを除くことによって抽出液中のAAを濃縮する方法を考案した。これにより、少ない量の水で試料からAAを抽出することができた。

### 3. クリーンアップ条件の検討

食品試料中には多くのマトリックスが存在し、MS分析の際にAAのイオン化を妨害する因子となっている。そこでクリーンアップ法を検討した。まず、試料抽出液中の油脂等を除くために、ヘキサン及びジクロロメタンによる脱脂を検討した結果、AAの回収率はほぼ同じであった。そこでヘキサンとジクロロメタンで実際の試料抽出液で操作した結果、ヘキサンはジクロロメタンに比べ界面に不溶物が多くみられたことから、ジクロロメタンで脱脂操作を行うこととした。

次にカートリッジカラムによるクリーンアップについて、C18, PSA, ACCUCAT, Envi-Carb (1000 mg, スペルコ社製), Oasis HLB (60及び200 mg, Waters社製)及びISOLUTE Multi Mode (500 mg, International Sorbent Technology社製)を用いて検討したが、これらのカートリッジカラムにAAを完全に吸着させることはできなかった。そこで、試料由来成分をカラムに吸着させて除くこととし、検討した結果、C18, ACCUCAT及びPSAカートリッジカラムによる精製が最も精製度が高かった。C18及びACCUCATの組み合わせはLC/MS/MSで測定しているスウェーデンのグループが使用しているMulti Mode<sup>12)</sup>と同じ種類の固相の組み合わせであった。しかしながら、この精製方法ではじゃがいも加工食品中のAAについては分析できるが、他の食品の分析を行うには精製が不十分であった。また、スウェーデンのグループが使用している遠心限外ろ過 (3kDa以上をカット)でも精製できなかった。

そこでカラムスイッチを用いたHPLCでの精製を検討した。スウェーデンのグループが用いているカーボンカラム<sup>12)</sup>に加え、C18, C30カラム及びゲルろ過カラム (MSpak) などを用いて検討したが、これらのカラムを単独で使用した場合には試料由来成分によるAAのイオン化阻害又は妨害ピークを完全に除くことができなかった。そこで性質の異なる2種類のカラムを組み合わせた分析方法を検討した。ゲルろ過とC18の組み合わせが最も良かったが、コーヒーやほうじ茶などでは妨害ピークが重なり分析することができなかった。そこでさらにカラム3種類を組み合わせた2段のカラムスイッチによる分析方法を検討した結果、カーボンカラム、ゲルろ過及びC18の組み合わせで行うことにより各種食品を妨害無く分析することができた。また、MS導入部にC30の短いカラムを付け、広がったAAピーク形状を改善するために使用した。実試料の分析例として図3にポテトチップスとコーヒー豆のSIRイオンクロマトグラムを示した。

### 4. 検量線と検出限界

AA-1-<sup>13</sup>Cを内標準とした検量線を作成した。

検量線はAAが5~500 ng/mLの範囲で良い直線性を示した ( $R^2 = 0.999$ ).

使用したAA-1- $^{13}\text{C}$ の同位体純度は99%で微量のAAを含むためにAA濃度が0 ng/mL(AA-1- $^{13}\text{C} = 200$  ng/mL)の溶液でもMS (SIR) ではAAのピークが観測された. そこでAA濃度が0 ng/mL(AA-1- $^{13}\text{C} = 200$  ng/mL)の検量線用標準溶液を3回測定しAAのピーク面積比のSDを求めこの3倍の値をLODとした. また, LOQはこのSDの10倍値とした. その結果, 固体試料でLODは9 ng/g, LOQは30 ng/g, 液体試料でLODは3 ng/g, LOQは10 ng/gであった. これはスウェーデンのLC/MS/MSでのLOD 10 ng/gと同等であった. 実態調査においてLODとLOQの間の値を示した場合は痕跡値 (tr) として各表に示した.

## 5. 添加回収実験

ポテトチップス, コーンスナック, プレッツェル及びほうじ茶についてAAを500 ng/g添加して添加回収実験を行い, その結果を表2に示した. 内標準であるAA-1- $^{13}\text{C}$ の回収率は, 67.9~82.8%であった. 無添加試料からは50~1008 ng/gのAAが検出され, SDは0.4~13 ng/g ( $RSD : 0.16 \sim 2.4\%$ ) であった. 添加試料の回収率は99.5~101.0%, SDは0.3~1.6%であった. この結果から本試験法は食品中のAAの分析法として十分な精度を持っているものと考えられた.

## 6. 実態調査

様々な食品試料について分析し, 固体食品試料については表3に, 液体食品試料については表4に結果を示した. 固体食品試料からの内標準の回収率は43.8~129.2% ( $69.1 \pm 9.2\%$ ), 液体食品試料からの回収率は62.9~100.7% ( $83.2 \pm 12.4\%$ ) であった. 内標準の回収率の変動はMS分析における試料由来化合物の影響によるイオン化の阻害, 分析操作中の分解などが原因と考えられる. 標準溶液中のAAは4℃又は10℃の暗所に保存する限りは安定であった. しかし, いくつかの試験溶液中のAAは1日で20~30%減少することもあった.

表3に示した ( ) 内の値はGC/MS法によって分析した結果である. LC/MSで分析した値とGC/MSで分析した値を比較すると, LC/MSの値はやや高い値 (約6.5%) を示した ( $y = 0.934x + 2.998$ ,  $r^2 = 0.999$ ). また, LC/MSによる分析は, GC/MSによる分析の1ヶ月後に行ったにもかかわらずほぼ同じ値を示したことから, これらの食品中でAAは安定であったと考えられる.

スウェーデン<sup>11)</sup>で, AAが高レベル(1000 ng/g) で検出された食品であるポテトチップスは同様に高い値を示し, 467~3544 ng/gであった.

フライドポテトはすべて異なるファーストフード店のものであるが, 512~784 ng/gの狭い濃度範囲のAAが検出され, また, スウェーデンの報告とも同レベルであった. 「二度揚げ」と表示されているかりんとうから1895 ng/gのAAが検出されたが, 他のかりんとうは374及び84 ng/gであった. コーンスナックには117~535 ng/gのAAが含まれていた. 煎りごま, ほうじ茶, 麦焦がし, 麦茶, コーヒー豆及びカレー粉のように, 煎る, ほうじるなどした食品からは116~535 ng/gのAAが検出された. 飯, ゆでそば, ゆでうどん, パン及びインスタント麺などの主食類では不検出~70 ng/gであった. スナックタイプのインスタント麺には 163 ng/gのAAが含まれていた. AAは植物性の原料からできている食品に多く含まれる傾向があったが, 生鮮農産物からは不検出であった. 生鮮農産物のホモジネートにAAを添加し, 水でホモジナイザーを使用して抽出すると農産物によっては添加したAAが分解するとの報告がある<sup>5)</sup>. しかし, 本実験で生鮮農産物試料に添加した内標準の回収率は66.3~78.0% ( $73.6 \pm 3.4\%$ )と加工食品類とほぼ同等の安定した回収率を得た. この理由として, 本実験ではスライスした試料に内標準を添加し, 水-アセトンを加えてからホモジナイズしたことによると考えられる.

同一メーカーの同一製品ではロットが異なってもほぼ同レベルのAAが含まれていた (ポテトチップス, 1008及び875 ng/g; コーンスナック, 535及び387 ng/g; プレッツェル, 50及び48 ng/g; ほうじ茶, 567及び538 ng/g).

食品中のAA含量は、食品加工時の温度や加熱時間といった条件により異なるものと考えられる。AAの生成には、主としてアスパラギン及びグルコース、フルクトースなどが必要とされ、これらの混合物から加熱によりメイラード反応が起こり、AAが生成することが報告されている<sup>16)~19)</sup>。

各種食品中のAA含量の傾向として、AA含量が高かったのは、フライドポテトを除き水分の少ない食品であった。また、茹でた食品より高温で揚げた食品に高い値のAAが含まれていた。さらに、小麦やとうもろこしを原料に使用している食品よりじゃがいもを原料とする食品の方が、AA含量が高い傾向にあった。

#### D. まとめ

1) GC/MSによる食品中のAA分析法を確立した。試料に内標準としてAA-1-<sup>13</sup>Cを添加して水抽出し、酸性条件下臭化カリウム-臭素酸カリウムで臭素化し、生じた2,3-DBPAをトリエチルアミンで脱臭化水素して2-BPAとしたのち、GC/MS(SIM)で定量した。ポテトチップス、コーンチップス、プレッツェル及びほうじ茶を用いて、100~1000 ng/gの添加濃度で添加回収実験を行った結果、回収率97~105%、相対標準偏差0.8~3.9%の良好な結果が得られた。また、検出限界は9 ng/gであった。

2) LC/MSによる食品中AAの分析法を確立した。内標準としてAA-1-<sup>13</sup>Cを添加後、試料を水及びアセトンで抽出し、ジクロロメタンで洗浄後、C18, ACCUCAT及びPSAカートリッジカラムで精製し、さらにカラムスイッチによるLC/MS(SIR)で定量した。ポテトチップス、コーンスナック、プレッツェル及びほうじ茶に500 ng/g相当量添加し実験を行った結果、回収率は99~101%、SDは0.3~1.6%であった。検出限界は9 ng/gであった。

3) 確立したGC/MS法及びLC/MS法で各種食品のAA含量を調査した。その結果、ポテトチップス及びフライドポテトから467~3544 ng/gのAAを、かりんとうの1種類を除いた他の食品からLOD~567 ng/gのAAを検出した。

## 第2部 加熱調理によるAAの生成

### A. 研究目的

第1部でGC/MS及びLC/MSによる食品中のAA分析法を確立し、日本国内の各種食品の実態調査を行った。その結果、高温で加熱され、水分含量の少ない食品から高い値のAAを検出した。

AAは主としてアスパラギンをグルコース、フルクトースなどとともに加熱することにより生成することが報告されている<sup>16)~18)</sup>。このメカニズムとして、アスパラギンとグルコース、フルクトースなどがシッフ塩基を生成し、オキシアゾリジン-5-オン中間体及びデカルボキシレートアマドリ化合物を経てAAが生成するとYaylayanらが報告している(図4)<sup>19)</sup>。

そこで、各種食材からのAA生成に及ぼす調理加工条件の影響を検討し、生成を抑える調理加工条件を明らかとするためにモデル実験及び実際の食材を使用した実験を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

乾燥マッシュポテト、薄力小麦粉、コーンミール、上新粉(こめ)、白玉粉(もち米)、洗いごま(生)、生アーモンド、りんご、ごぼう、にんじん、じゃがいも、さつまいも、たまねぎ、アスパラガス、かぼちゃ、キャベツ、なす、ピーマン、しいたけ、もやし及び食パン(8枚切り)

#### 2. 試薬・試液

標準品、溶媒、標準原液(100 µg/mL)、検量線用標準溶液は第1部IIの2. 試薬・試液参照。

その他試薬等: 酢酸(精密分析用、片山化学(株)製)、L-アスパラギン1水和物(特級)、D(+)-グルコース(特級)、デンプン(じゃがいも)(1級)及びデンプン(溶性、じゃがいも、アミロデキストリン)(1級)は何れも関東化学(株)製を使用した。

カートリッジカラムは第1部IIの2. 試薬・試液参照。

アルミシャーレ: アルミホイルシャーレNo. 1074及びFM2-1(株テラオカ製)。

### 3. 装置

LC/MS, ポンプ, 脱気装置, 自動6方バルブ, 攪拌機及び濃縮装置は第1部IIの3. 装置参照.

オーブンレンジ: 日立オーブンレンジMRO-G6 (株日立家電製)及びスチームオーブンレンジNE-J720 (松下電気産業(株)製)を使用した.

### 4. LC/MS測定条件

第1部IIの4. LC/MS測定条件参照.

### 5. 試料溶液調製法

第1部IIの5. 試料溶液調製法参照.

### 6. AAの検出と定量

第1部IIの6. AAの検出と定量参照.

### 7. 試料調製

#### 7.1. モデル実験用試料

5%グルコース含有デンプン(PSG): デンプン95 gにグルコース5 gを加えよく混和した.

5%グルコース含有溶性デンプン(SSG): 溶性デンプン95 gにグルコース5 gを加えよく混和した.

アスパラギン含有デンプン: デンプン50 gにアスパラギン114 mgを加えよく混和した.

アスパラギン含有溶性デンプン: 溶性デンプン50 gにアスパラギン114 mgを加えよく混和した.

アスパラギン含有PSG: PSG 50 gにアスパラギン114 mgを加えよく混和した.

アスパラギン含有SSG: SSG 50 gにアスパラギン114 mgを加えよく混和した.

#### 7.2. 農産物成型チップの作製

乾燥マッシュポテト, 薄力小麦粉, コーンミール, 上新粉及び白玉粉の粉体試料に温水を適量加えて練り(コーンミール, 上新粉及び白玉粉は電子レンジで30秒加熱), 団子を作製し, 粉体5 g相当量を取り直径6~7 cm, 厚さ約2 mmの円盤状に成型し, 50°Cで3時間乾燥させた.

#### 7.3. 生鮮農産物のスライスの作製

りんご, ごぼう, にんじん, じゃがいも, さつまいも, かぼちゃ, なすは1 cm角の直方体に切り, これを2~3 mmの厚さにスライスした. ごぼう, じゃがいも, なすはスライスした後, 灰汁抜きのため軽く水洗いした. たまねぎ, キャベツ及びピーマンは1 cm角になるようにカットした.

アスパラガスは袴をとり, 軸を2~3 mmにスライスした.

しいたけはかさを2~3 mmの厚さにスライスし, これを1 cm角に切った.

もやしは2 cmの長さに切りそろえた.

### 8. 加熱条件

#### 8.1. モデル実験の加熱条件

直径約6 cmのアルミシャーレに各試料5 gを取り, オーブン温度を120, 140, 160, 180, 200及び220°Cに設定し10分間及び, 180°Cで3, 5及び20分間加熱した.

なお, アスパラギンを含まない5%グルコース含有各デンプンについては180°C, 5及び10分間のみの条件で加熱した. これらの試料について分析を行った.

#### 8.2. 農産物粉体, 成型チップ等の加熱条件

##### 8.2.1. 粉体試料の加熱

乾燥マッシュポテト, 薄力小麦粉, コーンミール, 上新粉及び白玉粉を直径約6 cmのアルミシャーレに6 gとり, 180°Cで3, 5, 10及び20分間加熱した.

##### 8.2.2. 成型チップ等の加熱

乾燥マッシュポテト, 薄力小麦粉, コーンミール, 上新粉及び白玉粉のチップはアルミホイル(12×13 cm)に置いて, 生のアーモンド(6粒, 約6 g)及びごま(6 g)はアルミシャーレにとり, 120, 140, 180及び200°Cで10分間及び, 180°Cで5, 10及び20分間加熱を行った. また, マッシュポテトのチップについてはアルミホイル(12×13 cm)で軽く覆ったものについても加熱を行った.

#### 8.3. 生鮮農産物の加熱条件

##### 8.3.1. 生鮮農産物のオーブンによる加熱