

略語

COC: 食品、消費者製品、環境中化学物質のがん原性に関する科学委員会(英国)

ANSES: フランス食品環境労働衛生安全庁

EFSA: 欧州食品安全機関

FSA: 英国食品基準庁

JECFA: FAO/WHO合同食品添加物専門家会議

RIVM: オランダ 国立公衆健康環境研究所

CFS: 香港食物環境衛生署食品安全センター

BfR: ドイツ連邦リスク評価研究所

AFSCA: ベルギー連邦フードチェーン安全庁

FSAI: アイルランド食品安全局

BMDL: ベンチマーク用量95%信頼下限値

BMDL₁₀: 腫瘍発生が10%増加するBMDL

NOAEL: 無影響量、有害影響が観察されない最高投与量

2. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果に関する刊行物一覧表

整理番号	発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	渡邊敬浩、石川智子、松田りえ子	GC-FIDを用いたトランス脂肪酸分析法の性能評価手法および性能基準値の検討	食品衛生学雑誌	54	31-48	2013
2	堤 智昭、松田りえ子	食品からのダイオキシン類摂取量推定	食品衛生研究	63	7-19	2013
3	畝山智香子	食の安全とは	日本食品安全協会会報	8	47-51	2013
4	畝山智香子	食品中化学物質のリスク評価について	イルシー	115	15-20	2013
5	Amakura, Y., Yoshimura, M., Takaoka, M., Toda, H., Tsutsumi, T., Matsuda, R., Teshima, R., Nakamura, M., Handa, H., Yoshida, T.	Characterization of natural aryl hydrocarbon receptor agonists from cassia seed and rosemary	<i>Molecules</i>	19	4956-4966	2014
6	Takahashi K, Hori T, Kajiwara J, Watanabe T.	Determination of hexabromocyclododecane in fish samples collected from Japanese markets	Organohalogen Compounds	76	930-933	2014
7	Hori T, Miyawaki T, Takahashi K, Yasutake D, Yamamoto T, Kajiwara J, Watanabe T.	Concentration of Dechlorane Plus in fish samples collected in Kyushu district, western Japan.	Organohalogen Compounds	76	900-903	2014
8	Tsutsumi T, Watanabe T, Matsuda R, Teshima R.	Dietary intake of dioxins in Japan, fiscal year 1998-2013	Organohalogen Compounds	76	1325-1328	2014
9	畝山智香子	農薬や放射性物質等の食品中化学物質のリスクについて	小児科臨床	67	2503-2509	2014
10	畝山智香子	食品中化学物質のリスクについて	香料	262	33-39	2014
11	畝山智香子、登田美桜	10年間の食品安全情報で収集した「いわゆる健康食品」についての海外情報の傾向について	日本食品安全協会会報	9	32-35	2014
12	Watanabe T, Kikuchi H, Matsuda R, Tomoko Hayashi T, Akaki K and Teshima R.	Performance evaluation of an improved GC-MS method to quantify methylmercury in fish	J. Hood Hyg. Soc. Japan	56	69-76	2015
13	渡邊敬浩、堤 智昭	食品に含まれる有害物質トランス脂肪酸と多環芳香族炭化水素類	公衆衛生	79	777-782	2015
14	Takahashi K, Yasutake D, Kajiwara J, Watanabe T.	Dietary intake of hexabromocyclododecane in Japan.	Organohalogen Compounds	77	416-418	2015
15	Yasutake D, Hori T, Takahashi K, Kajiwara J and Watanabe T	Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxylated PCBs in seafood samples collected in Kyusyu district, Japan.	Organohalogen Compounds	77	386-389	2015
16	畝山智香子、登田美桜	世界各国のトランス脂肪酸のリスク評価について	食品衛生研究	65	15-25	2015
17	Amakura, Y., Tsutsumi, T., Yoshimura, M., Nakamura, M., Handa, H., Matsuda, R., Teshima, R., Watanabe, T.	Detection of aryl hydrocarbon receptor activation by some chemicals related in food hygiene by using a reporter gene assay	Foods	5	doi:10.3390/foods5010015	2016

3. 研究成果の刊行物別刷

報 文

GC-FIDを用いたトランス脂肪酸分析法の性能評価手法
および性能基準値の検討

(平成24年8月29日受理)

渡邊敬浩* 石川智子 松田りえ子

Studies on Performance Evaluation and Criteria for *trans*-Fatty
Acids Analysis Using GC-FID

Takahiro WATANABE*, Tomoko ISHIKAWA and Rieko MATSUDA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

* Corresponding author

Performance evaluation methods and criteria for *trans*-fatty acids analysis using GC-FID were examined. The measurement method constructed in this study was based on the American Oil Chemists' Society (AOCS) official standard methods Ce1h-05. The method for fat extraction from general foods was based on the methods for nutrition labeling notified by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and AOAC 996.06. To estimate trueness and precision, fortified samples were analyzed following the established experimental design. Five molecular species of *trans*-fatty acids that are rarely contained in foods were used for preparing the fortified samples. To estimate precision, more than four degrees of freedom of variance are required. Based on the results, within-laboratory trueness and reproducibility will be set at 90–110% and 10% (RSD%), respectively.

(Received August 29, 2012)

Key words: トランス脂肪酸 *trans*-fatty acid; 性能評価 performance evaluation; 性能基準 performance criteria; 真度 trueness; 精度 precision

緒 言

平成23年2月に、「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針について」(以下、指針)^{*1}が消費者庁により公開された。本指針により、食品事業者が自主的な努力によってトランス脂肪酸含量を表示することが求められている。トランス脂肪酸は、Codex委員会により「少なくとも1つ以上のメチレン基で隔てられたトランス型の非共役炭素-炭素二重結合を持つ単価不飽和脂肪酸および多価不飽和脂肪酸のすべての幾何異性体」と定義されている¹⁾。この定義が示すとおり、トランス脂肪酸とは、一定の構造特性を有する多種類の化合物(トランス脂肪酸分子種)の総称である。定義に合致するすべてのトランス脂肪酸分子種が明らかにされているわけではなく、また分析に不可欠な標準試

薬の入手も限られている。

トランス脂肪酸の分析では、各分子種の量の総和をトランス脂肪酸量とする。そのため、定義に合致する分子種を選択的に測定し、得られた信号の総和の変動が、トランス脂肪酸量への影響を無視できるほどに小さいことの証明があれば、必ずしも個々の分子種を同定し定量する必要はない。しかし、トランス型の二重結合を選択的に測定可能とされるinfrared spectroscopy (IR)法^{2)~4)}の感度は、表示制度に求められるほどに低濃度のトランス脂肪酸を定量するためには不十分である。一方、GC-FIDを用いた測定法(GC-FID法)は、表示を目的とした方法として十分な感度を有しており指針にも示されているが、各トランス脂肪酸分子種の分離・同定が必要である。GC-FID法の1つであるAOCS Ce1h-05⁵⁾は、The American Oil Chemists' Society (AOCS)の公認法であり、Codex委員会により栄養成分表示のための方法および、乳児用食品を対象とする方法として承認されている⁶⁾。食用油脂を除く食品からは、脂質を抽出しなければGC-FID法により測定できない。抽出される脂質の構成は、抽出法により変化すると

* 連絡先: tawata@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀1-18-1

*1 消費者庁「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針について」(平成23年2月21日)

<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin505.pdf>

考えられるため、その選択が重要となる。

GC-FID法を採用する場合、事業者間での表示内容の一致のためには、測定対象とするトランス脂肪酸分子種が統一されていなければならない。また、抽出される脂質中のトランス脂肪酸分子種の構成が変化する可能性を考慮すれば、同じ脂質抽出法を用いる必要がある。このように、事業者間や食品間で内容に不一致のないトランス脂肪酸表示を実施するためには、その科学的根拠を得る分析において、測定対象を明確に定めることと、GC-FID法と脂質抽出法を合わせた分析法としての検討が必要である。また、食品の多様性に応じて、分析法も多様でありうる。しかし、どのような分析法を用いるにせよ、表示内容の正当性を保証するのに妥当な分析結果を得られる性能が求められる。性能の証明には、分析法の性能を評価する手法と基準が必要である。そこで本研究では、食品表示を目的としたトランス脂肪酸分析法の一例を構築するとともに、性能評価手法および性能基準値について検討した。

実験方法

1. 試料

大豆油、なたね油、サフラワー油、ショートニングを東京都世田谷区内の小売店もしくはインターネットを通じて購入し食用油脂を代表する試料とした。同様に購入したデニッシュペストリーを一般食品の代表とし、ホモジナイザーで均質化して試料とした。なお、試料としたデニッシュペストリーは、小麦粉、ファットスプレッド、糖類、マーガリン、卵を上位5種の原材料とする製品である。

2. 試薬

本研究では、61種の脂肪酸メチルエステル標準試薬を用いた。61種中には21種のトランス脂肪酸分子種を含む。使用した全脂肪酸分子種をTable 1に示す。また、C18:1の位置および幾何異性体(計26分子種)を和光純薬工業株式会社を通じて合成し用いた。

内部標準用標準試薬: 内部標準には、Triundecanoin (C11:0), Tritridecanoin (C13:0), Triheptadecanoin (C17:0), Triheneicosanoin (C21:0) のトリグリセライド (TAG) を用いた (いずれも Nuchek 社製)。

脂肪酸メチルエステル混合標準試薬: 下記の混合標準試薬を用いた。GLC-674: Reference Standard, Fatty Acid Methyl Esters (Nuchek 社製), Linoleic Acid Methyl Ester Mix, *cis/trans* (Supelco 社製), Linolenic Acid Methyl Ester Isomer Mix (Supelco 社製)。

添加用遊離トランス脂肪酸標準試薬: 添加試料の調製には、以下のトランス脂肪酸分子種を用いた。10E-Pentadecenoic Acid (C15:1 10t), 9E-Hexadecenoic Acid (C16:1 9t), 10E-Heptadecenoic Acid (C17:1 10t), 11E-Eicosenoic Acid (C20:1 11t), 13E-Docosenoic Acid (C22:1 13t) (いずれも Nuchek 社製)。

その他の試薬: クロロホルム (特級), エタノール (特級), ジエチルエーテル (特級), メタノール (特級), *n*-

Table 1. List of molecular species of fatty acids used as standard in this study

Analyte No.	Fatty acid	Analyte No.	Fatty acid
1	C4:0	31	C18:3 (9t, 12t, 15t)
2	C6:0	32	C18:3 (9t, 12t, 15c)
3	C8:0	33	C18:3 (9t, 12c, 15t)
4	C10:0	34	C18:3 (6c, 9c, 12c)
5	C11:0	35	C18:3 (9c, 12c, 15t)
6	C12:0	36	C18:3 (9c, 12t, 15t)
7	C13:0	37	C18:3 (9c, 12t, 15c)
8	C14:0	38	C18:3 (9t, 12c, 15c)
9	C14:1 (9t)	39	C18:3 (9c, 12c, 15c)
10	C14:1 (9c)	40	C19:1 (7t)
11	C15:0	41	C19:1 (10t)
12	C15:1 (10t)	42	C20:0
13	C15:1 (10c)	43	C20:1 (11t)
14	C16:0	44	C20:1 (11c)
15	C16:1 (9t)	45	C20:2 (11c, 14c)
16	C16:1 (9c)	46	C20:3 (8c, 11c, 14c)
17	C17:0	47	C20:3 (11c, 14c, 17c)
18	C17:1 (10t)	48	C20:4 (5c, 8c, 11c, 14c)
19	C17:1 (10c)	49	C20:5 (5c, 8c, 11c, 14c, 17c)
20	C18:0	50	C21:0
21	C18:1 (6t)	51	C22:0
22	C18:1 (9t)	52	C22:1 (13t)
23	C18:1 (11t)	53	C22:1 (13c)
24	C18:1 (6c)	54	C22:2 (13c, 16c)
25	C18:1 (9c)	55	C22:4 (7c, 10c, 13c, 16c)
26	C18:1 (11c)	56	C22:5 (4c, 7c, 10c, 13c, 16c)
27	C18:2 (9t, 12t)	57	C22:5 (7c, 10c, 13c, 16c, 19c)
28	C18:2 (9c, 12t)	58	C22:6 (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c)
29	C18:2 (9t, 12c)	59	C23:0
30	C18:2 (9c, 12c)	60	C24:0
		61	C24:1 (15c)

ヘプタン (環境分析用), 水酸化ナトリウム (特級), 塩化ナトリウム (残留農薬・PCB 試験用), 硫酸ナトリウム (特級) (以上, 和光純薬社製), 塩酸 (原子吸光分析用), 石油エーテル (特級) (以上, 関東化学(株)社製), 14%三フッ化ホウ素メタノール錯体/メタノール溶液 (シグマアルドリッチ社製), 水 (MilliQ水). 8.3 mol/L塩酸は、塩酸と水を 25:11 (v/v) の比率で混合し調製した。

3. 標準溶液

内部標準溶液: 食用油脂の分析には、4種のTAGを精密に量り取りそれぞれ5 mg/mLの濃度になるようクロロホルムに溶解して用いた。デニッシュペストリーの分析には、C11:0, C13:0, C17:0のTAGを精密に量り取り、それぞれ20 mg/mLの濃度になるようクロロホルムに溶解して用いた。C21:0のTAGは、脂質の抽出溶媒に溶解しなかったため、デニッシュペストリー分析の内部標準として使用できなかった。

脂肪酸メチルエステル混合溶液: 購入した試薬製品の溶媒を窒素吹きつけにより除去した後、*n*-ヘプタンに再溶解して用いた。

添加用遊離トランス脂肪酸溶液: 食用油脂に添加する場合には、C15:1 (10t), C16:1 (9t), C17:1 (10t), C20:1 (11t), C22:1 (13t) を精密に量り取り、クロロホルムに溶解して0.15 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mLの

濃度になるように調製した。デニッシュペストリーに添加する場合には、1.2 mg/mL, 2.4 mg/mL, 6.0 mg/mLの濃度に調製した。

4. 添加試料の調製

各濃度の添加用遊離トランス脂肪酸溶液1 mLを各種試料に添加し十分に混合した後、窒素を吹きつけることによりクロロホルムを除いて、添加試料を調製した。

5. 分析法の性能評価

GC-FIDによる測定では、十分に分離しその保持時間が安定していなければ、各トランス脂肪酸分子種を同定し定量することはできない。本研究では、測定対象になりうるトランス脂肪酸分子種の分離と保持時間の変動を分析法の性能パラメータとしては評価せず、性能評価以前に確認すべき前提とした。分析に含まれるさまざまな要因により、定量値は真値から乖離し、また変動する可能性があるが、その大きさが分析結果の品質を表すと言える。そこで、真度および精度（併行精度ならびに室内精度）を推定し、分析法の性能として評価した。性能評価のための実験は、分散推定時の自由度が4以上となるよう計画した。

6. 機器

GC-FID (Agilent 6890: アジレント社製)、振とう機能つき温浴槽 (SH12付き Personal H10: タイテック社製)、振とう抽出機 (エルビスシェイカー: スギヤマゲン社製)を用いた。

7. 分析法の構築

脂質抽出法は、AOAC インターナショナルの公認法 (AOAC 996.06)⁷⁾ に示された方法および、厚生労働省が通知する栄養成分表示のための分析法 (厚労法)^{*2}を原法とした。GC-FID法は、AOCSの公認法 (Ce1h-05)を原法とした。これら原法を元に構築した分析法は、食用油脂および一般食品を適用対象とする。また、測定対象は炭素数が14~22であり標準試薬が入手可能であった21種のトランス脂肪酸分子種に限定される。分析法の詳細を以下に示す。

1) 脂質抽出法

2.0 gのデニッシュペストリーを蓋付きガラス瓶に量り取り、内部標準溶液2.0 mLを正確に加えた。これにエタノール10 mLを加えて混和し浸潤させた後、8.3 mol/L塩酸25 mLを加えた。蓋をして80°Cで40分間穏やかに振とうし、酸分解した。放冷後、分解液を分液漏斗に移した。分解に用いたガラス瓶をエタノール20 mLで洗浄し、洗浄液を分解液に合わせた。分解液にジエチルエーテル60 mLを加え5分間振とうした。振とう後、石油エーテル60 mLを加え同じく振とう抽出した。静置後、分離した有機溶媒層を抽出液とした。水層を別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテルおよび石油エーテル混液 (1:1) 60 mLを加え、振とう抽出した。水層からの抽出は2回行った。

*2 厚生省生活衛生局保健課新開発食品保健対策室長通知“栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について”(平成11年4月26日付け、衛新第13号)

抽出液を合わせ、水40 mLを加え1分間振とう洗浄し、水層を捨てた。洗浄操作を4回繰り返した後、抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ別した後、40°C以下で溶媒を除去した。残留物として得られた脂質の重量を精密に秤量した後、その100 mgを脂肪酸メチルエステルの調製に供した。

2) GC-FID法

抽出した脂質あるいは食用油脂100 mgを精密に量り、食用油脂の場合は内部標準溶液2.0 mLを正確に加えた。0.5 mol/L水酸化ナトリウム/メタノール溶液3 mLを加え、容器内を窒素で置換した後に密栓し、100°Cで7分間加熱した。放冷後、14%三フッ化ホウ素メタノール錯体/メタノール溶液2 mLを加え、100°Cで5分間加熱した。放冷後、*n*-ヘプタン1 mLを加え1分間激しく振とうした。次いで飽和塩化ナトリウム溶液5 mLを加えよく振り混ぜた後、600×gで10分間遠心分離し、*n*-ヘプタン層を得た。水層に*n*-ヘプタン1 mLを加え、抽出および分離を繰り返す。得られた*n*-ヘプタン層を合わせて測定溶液とした。

3) 測定条件

GC-FID

カラム: SPTM-2560 (内径0.25 mm, 長さ100 m, 膜厚0.20 μm, Supelco社製)

カラム温度: 180°C

注入口および検出器温度: 250°C

キャリアーガス: ヘリウム

キャリアーガス流量: 1 mL/min

注入量: 1 μL

スプリット比: 100:1

4) 定量

測定溶液1 μLをGC-FIDに注入して得られる、各脂肪酸メチルエステルのピーク面積 (A_x および A_{TAG}) から、下の計算式 (式(1)~(3)) に従い、食品100 gあたりのトランス脂肪酸含量を求めた。

$$W_{FAME_x} (g) = \frac{A_x \times W_{TAG} \times CF_{TAG} \times TCF}{A_{TAG}} \quad (1)$$

$FAME_x$: トランス脂肪酸分子種メチルエステル体

W_{FAME_x} : $FAME_x$ の重量 (g)

A_x : $FAME_x$ のピーク面積

W_{TAG} : TAGの添加量 (g)

CF_{TAG} : TAGを脂肪酸メチルエステルに換算するための係数

TCF: 理論FID感度補正係数

A_{TAG} : TAG由来の脂肪酸メチルエステルのピーク面積

$$W_{TFA} (g) = \sum (W_{FAME_x} \times F_{FA_x}) \quad (2)$$

W_{TFA} : 100 mg脂質中のトランス脂肪酸の量

F_{FA_x} : W_{FAME_x} を対応するトランス脂肪酸分子種の重量に換算するための係数

食品中のトランス脂肪酸量 (g/100 g)

$$= W_{TFA} \times \frac{\text{脂質重量(mg)}}{100(\text{mg})} \times \frac{100(\text{g})}{\text{試料重量(g)}} \quad (3)$$

本研究で使用した C11:0, C13:0, C17:0, C21:0 に対する CF_{TAG} は、それぞれ 1.0068, 1.0059, 1.0047, 1.0040 である。また、本研究で測定対象としたトランス脂肪酸分子種を含む各種脂肪酸の TCF を、内部標準としたトリグリセライドとの組み合わせとして Table 2 に示す。

結果および考察

1. 分析法の構築

一般に、測定対象が事前に決定されていなければ、分析することはできない。例えば、国により、ある食品に含まれるある化学物質の上限の濃度が基準として定められるような場合には、国によって、測定対象が明示される必要がある。明示されなければ、測定対象は分析者が決めることになる。この場合、同一試料を分析したとしても、分析者ごとに結果が異なる可能性を否定できない。トランス脂肪酸表示のための分析でも同様である。GC-FID 法では、測定対象としたトランス脂肪酸分子種の標準試薬を試料と同じ条件で測定し、結果を比較し同定後、定量する。さらに GC-FID により検出された信号を特定の化学物質由来であると主張する根拠は保持時間のみである。同じ保持時間で検出される、つまり分離できない複数の化学物質を個々に

定量することはできない。これは原理的な制約である。さらに、食用油脂以外の食品からは脂質を抽出しなければならない。脂質を含む成分は食品種ごとに多様であるため、個々の食品に適した抽出法を選択する必要がある。さらに脂質抽出法には定義分析法⁹⁾としての側面もあるため、すでに規定されている方法があれば、それを準用することが適当と考える。これらの事実と考察を背景に、国際的な方法への整合性も考慮し、分析法を構築した。

1) 脂質抽出法

分析法の対象を、一般食品とした。このことから、AOAC 996.06 と厚労法に記載の方法のうち、同食品を対象とする酸分解法を原法として検討を進めた。ピロガロールは、酸性条件下での分解に不要と考え用いなかった。試料量は 2.0 g とした。これは食品表示から、試料としたデニッシュペストリーの脂質含量が約 20% であるという情報を得て、メチルエステル化に供する 100 mg の脂質を安定して抽出可能と判断したためである。一般には、内部標準とする TAG の濃度が過度に低下しないことに留意しつつ、均質性を考慮して、より多量の試料を抽出に用いることが適切と考える。なお食品中での脂肪酸の存在状態を考慮し、TAG を内部標準とした。

2) GC-FID 法

GC-FID 法では、食用油脂あるいは食品から抽出した脂質を加水分解し、生じた遊離脂肪酸をメチルエステル誘導

Table 2. Theoretical conversion factors (TCF) for each molecular species of fatty acids used to calculate the quantity

Fatty acid	TCF				Fatty acid	TCF			
	I.S. C11:0	I.S. C13:0	I.S. C17:0	I.S. C21:0		I.S. C11:0	I.S. C13:0	I.S. C17:0	I.S. C21:0
C4:0	1.4020	1.4534	1.5257	1.5742	C18:2 (9c,12c)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087
C6:0	1.1914	1.2351	1.2966	1.3378	C18:3 (9t,12t,15t)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C8:0	1.0861	1.1259	1.1820	1.2196	C20:0	0.8966	0.9295	0.9757	1.0068
C10:0	1.0230	1.0604	1.1132	1.1486	C18:3 (9t,12t,15c)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C11:0	1.0000	1.0366	1.0882	1.1228	C18:3 (9t,12c,15t)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C12:0	0.9809	1.0168	1.0674	1.1013	C18:3 (6c,9c,12c)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C13:0	0.9647	1.0000	1.0498	1.0831	C18:3 (9c,12c,15t)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C14:0	0.9508	0.9856	1.0347	1.0676	C18:3 (9c,12t,15t)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C14:1 (9t)	0.9429	0.9774	1.0261	1.0587	C20:1 (11t)	0.8911	0.9237	0.9697	1.0005
C14:1 (9c)	0.9429	0.9774	1.0261	1.0587	C18:3 (9c,12t,15c)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C15:0	0.9387	0.9731	1.0216	1.0540	C18:3 (9t,12c,15c)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C15:1 (10t)	0.9314	0.9655	1.0135	1.0458	C20:1 (11c)	0.8911	0.9237	0.9697	1.0005
C15:1 (10c)	0.9314	0.9655	1.0135	1.0458	C18:3 (9c,12c,15c)	0.8922	0.9249	0.9709	1.0018
C16:0	0.9282	0.9622	1.0101	1.0422	C21:0	0.8906	0.9232	0.9692	1.0000
C16:1 (9t)	0.9213	0.9550	1.0026	1.0345	C20:2 (11c,14c)	0.8856	0.9180	0.9637	0.9943
C16:1 (9c)	0.9213	0.9550	1.0026	1.0345	C22:0	0.8851	0.9176	0.9632	0.9939
C17:0	0.9189	0.9526	1.0000	1.0318	C20:3 (8c,11c,14c)	0.8800	0.9123	0.9577	0.9881
C17:1 (10t)	0.9124	0.9458	0.9929	1.0245	C22:1 (13t)	0.8801	0.9124	0.9578	0.9882
C17:1 (10c)	0.9124	0.9458	0.9929	1.0245	C20:3 (11c,14c,17c)	0.8800	0.9123	0.9577	0.9881
C18:0	0.9107	0.9440	0.9910	1.0225	C22:1 (13c)	0.8801	0.9124	0.9578	0.9882
C18:1 (6t)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C20:4 (5c,8c,11c,14c)	0.8745	0.9065	0.9516	0.9819
C18:1 (9t)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C23:0	0.8801	0.9124	0.9578	0.9883
C18:1 (11t)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C22:2 (13c,16c)	0.8751	0.9071	0.9523	0.9826
C18:1 (6c)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C20:5 (5c,8c,11c,14c,17c)	0.869	0.9008	0.9456	0.9757
C18:1 (9c)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C24:0	0.8756	0.9076	0.9528	0.9831
C18:1 (11c)	0.9045	0.9377	0.9843	1.0156	C24:1 (15c)	0.8710	0.9029	0.9478	0.9779
C18:2 (9t,12t)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087	C22:4 (7c,10c,13c,16c)	0.8650	0.8967	0.9413	0.9713
C18:2 (9c,12t)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087	C22:5 (4c,7c,10c,13c,16c)	0.8600	0.8915	0.9359	0.9656
C19:1 (7t)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087	C22:5 (7c,10c,13c,16c,19c)	0.8600	0.8915	0.9359	0.9656
C18:2 (9t,12c)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087	C22:6 (4c,7c,10c,13c,16c,19c)	0.8550	0.8863	0.9304	0.9600
C19:1 (10t)	0.8984	0.9313	0.9776	1.0087					

体として測定する。このメチルエステル化反応に供する食用油脂あるいは脂質の量は、FIDによる検出の感度を考慮し100 mgとした。また、一部の試料で脂質の加水分解が不十分と考えられる測定結果が得られたため、0.5 mol/L水酸化ナトリウム/メタノール溶液量を3 mLとした。

GC-FID法により分離・同定可能なトランス脂肪酸分子種について確認した。21種のトランス脂肪酸分子種を含む61種の脂肪酸メチルエステル標準試薬 (Table 1) をGC-FID法により測定し得られた、代表的なクロマトグラムをFig. 1に示す。標準試薬の測定結果から、C18:2 (9c,12t) とC19:1 (7t), C18:2 (9t,12c) とC19:1 (10t), C18:3 (9t,12t,15c) とC18:3 (9t,12c,15c), C18:3 (9c,12c,15t) とC18:3 (9c,12t,15t) は分離できないことが明らかとなった (Fig. 1)。これら4つの組み合わせでは、個々の分子種ごとに定量することはできない。しかし、トランス脂肪酸として定量することは可能なため、21種のトランス脂肪酸分子種が測定対象となる。今後、新たに標準試薬が入手可能となることで測定対象の候補が増える可能性もある。いずれにせよ、測定対象が定められて初めて、測定量が一意に定まることとなり、事業者間での表示内容が一致する。また、妥当な分析結果が得られることを、新たに分析する食品種や開発した分析法について性能を評価し、確認できるようになる。

各食品に含まれる脂肪酸分子種の量や組成はさまざまであるため、これら脂肪酸分子種の分離に関する、より多くの情報を得ることが、実際の分析に役立つ。そこで、多くの食品に主に含まれるC18:1の脂肪酸について、その位置および幾何異性体の分離を確認した。その結果、測定に供した26種の脂肪酸分子種のうち、複数の脂肪酸分子種が分離しないことが明らかとなった (Fig. 2)。また、一部のシス型の脂肪酸分子種とトランス脂肪酸分子種が分離しないことも確認された。仮にこの不分離を見落とし定量すれば、シス型の脂肪酸量を定量結果に含めることに起因する正のバイアスを分析結果に与える。この問題を改善するために、カラムの選択やGC条件の最適化により、分離を向上させることも考えられる。しかし、そのような向上にも限界はあり、全てのトランス脂肪酸分子種を分離・同定することは困難であろう。一方で、シス型の脂肪酸分子種を含む有機化合物を、事前に除去することも有効と考えられる^{9)~11)}。ただし、そのためには、精製効果が意図する化学物質だけに現れることの確認が不可欠である。標準試薬がなければ同定できないことに加えて、精製効果の確認もできない。正確な分析の実行という観点からは、より多数の標準試薬の整備が望まれる。

2. 性能評価手法の検討

本研究で構築したトランス脂肪酸分析法は、一例である。指針では、表示対象とする食品が制限されていないため、別の分析法を開発あるいは構築する必要が生じるだろう。それらの分析法は、食品表示の目的を等しく達成するために、一定の性能を満たしていなければならない。この

考えは、分析法の国際的な承認が性能基準値に基づく評価を中心に行われていることや、厚生労働省により分析法の妥当性評価ガイドライン^{*3,*4)}が示されていることから理解される。そこでまず、トランス脂肪酸分析法の性能評価手法を検討した。

1) 性能評価以前に確認すべき事項

性能評価の前提として、以下の事項が満たされていないなければならない。1) 測定対象とするトランス脂肪酸分子種とその測定への影響が考えられる脂肪酸分子種とが、分析対象となる食品の特性に応じて適切に選択されていること、2) 選択したすべての脂肪酸分子種について、標準試薬の繰り返し測定により、分離と保持時間およびその変動に関する情報 (リテンションタイムプロファイル) が得られていること、3) 保持時間の変動が同定と定量に影響しない大きさであること。

本研究では、測定対象とした21種のトランス脂肪酸分子種を含む、61種の脂肪酸分子種を選択した。事実上、標準試薬として入手可能か否かが選択の制限となる。61種の脂肪酸分子種のメチルエステル標準試薬を1日あたり1回測定し、これを7日間繰り返して作成したリテンションタイムプロファイルをTable 3に示す。分離しなかった脂肪酸分子種はいずれもトランス脂肪酸であったため、分子種を同定せず定量することとした。また、保持時間の標準偏差に係数3を乗じ、得られた値を加味した範囲を、日常的な保持時間の変動範囲ととらえ、同定の際の指標とした。

上記前提の2) および3) の確認により、分離しないことあるいは保持時間の変動が大きいことが明らかとなったトランス脂肪酸分子種は測定することができない。使用するカラムのロットの違いや分析の繰り返しによる劣化によっても分離の程度に変化が生じる。また実際の分析では、対象食品に含まれる各脂肪酸分子種の種類と量を原因として、分離の程度が変わる可能性もある。リテンションタイムの変動と同定を誤る確率との関係に、一律の数値目標を設定することはできない。各試験室が、真度や精度の推定結果も踏まえつつ、未知試料の分析に先立ち確認し、独自に達成、管理しなければならない。

2) 性能評価項目の設定と実験計画

必ず評価すべき定量分析法の性能として、真度と精度 (併行らびに室内精度) を設定した。併行条件ならびに再現条件下での精度推定に最低限の信頼性を同程度に確保するため、分散推定時の自由度を4以上とした。具体的には、1日2点の添加試料を併行分析し、これを5日間実施することを実験計画とした。添加試料の検討について、以下に述べる。

3) 添加するトランス脂肪酸分子種を選択

分析法の真度ならびに精度を推定するためには、均質な試料を計画的に分析して得られる一連の定量値が必要となる。均質性が保証された試料として、(認証) 標準試料が挙げられる。しかし、トランス脂肪酸分析も含め、多くの

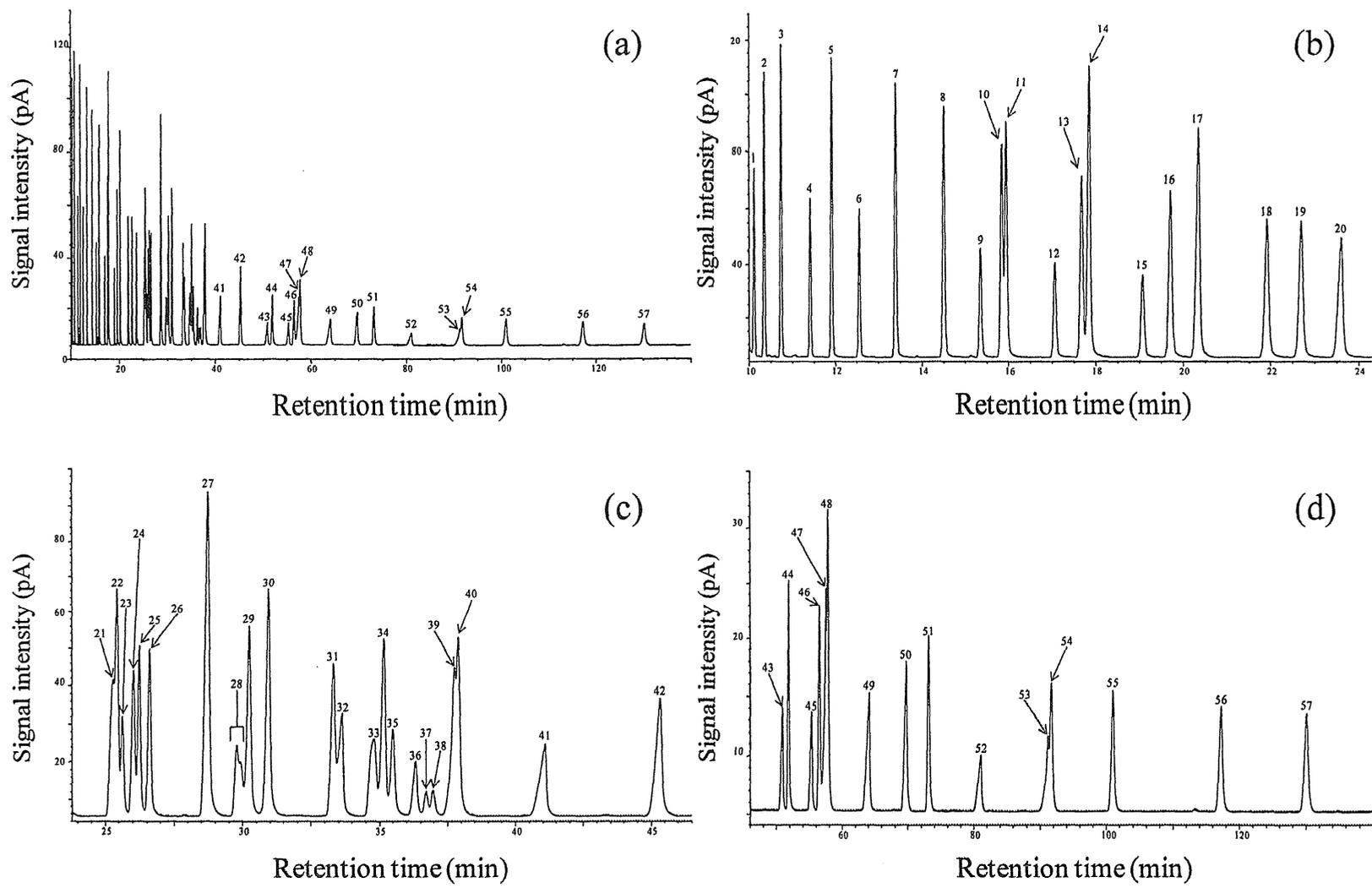


Fig. 1. Representative GC chromatograms of molecular species of fatty acids used as standards in this study
 GC chromatograms for whole measurement time (a), for 10 to 24 min (b), for 24 to 46 min (c), and for 46 to 140 min (d). Peak numbers are the same as "Peak No." in Table 3.

Table 3. Retention time profile for molecular species of fatty acids used as standards in this study

Peak No.	Fatty acid	Retention time (min)				Peak No.	Fatty acid	Retention time (min)			
		Ave.	S.D.	Range ($\pm 3\sigma$)				Ave.	S.D.	Range ($\pm 3\sigma$)	
				Start	End					Start	End
1	C4:0	10.31	0.002	10.30	10.31	31	C18:3 (9t,12t,15t)	33.76	0.034	33.66	33.86
2	C6:0	10.55	0.003	10.54	10.56	32	C20:0	34.04	0.079	33.80	34.28
3	C8:0	10.95	0.003	10.94	10.96	33	C18:3 (9t,12t,15c)	35.26	0.039	35.14	35.38
4	C10:0	11.62	0.004	11.61	11.64	34	C18:3 (6c,9c,12c)	35.63	0.031	35.54	35.72
5	C11:0	12.13	0.004	12.11	12.14	35	C18:3 (9c,12c,15t)	35.95	0.035	35.85	36.06
6	C12:0	12.78	0.004	12.77	12.79	36	C20:1 (11t)	36.77	0.076	36.54	37.00
7	C13:0	13.63	0.004	13.62	13.64	37	C18:3 (9c,12t,15c)	37.19	0.039	37.07	37.30
8	C14:0	14.75	0.006	14.73	14.77	38	C18:3 (9t,12c,15c)	37.45	0.040	37.33	37.57
9	C14:1 (9t)	15.61	0.006	15.60	15.63	39	C20:1 (11c)	38.20	0.061	38.02	38.39
10	C14:1 (9c)	16.11	0.005	16.10	16.13	40	C18:3 (9c,12c,15c)	38.40	0.033	38.30	38.49
11	C15:0	16.21	0.008	16.19	16.23	41	C21:0	41.53	0.116	41.18	41.88
12	C15:1 (10t)	17.33	0.008	17.31	17.36	42	C20:2 (11c,14c)	45.88	0.075	45.66	46.11
13	C15:1 (10c)	17.96	0.008	17.94	17.98	43	C22:0	51.39	0.196	50.80	51.98
14	C16:0	18.14	0.012	18.10	18.17	44	C20:3 (8c,11c,14c)	52.51	0.073	52.29	52.73
15	C16:1 (9t)	19.36	0.012	19.32	19.40	45	C22:1 (13t)	55.89	0.186	55.33	56.45
16	C16:1 (9c)	20.01	0.012	19.97	20.04	46	C20:3 (11c,14c,17c)	57.18	0.089	56.92	57.45
17	C17:0	20.65	0.020	20.59	20.71	47	C22:1 (13c)	58.07	0.141	57.64	58.49
18	C17:1 (10t)	22.24	0.020	22.18	22.30	48	C20:4 (5c,8c,11c,14c)	58.50	0.068	58.30	58.70
19	C17:1 (10c)	23.02	0.019	22.97	23.08	49	C23:0	64.73	0.231	64.03	65.42
20	C18:0	23.94	0.038	23.83	24.05	50	C22:2 (13c,16c)	70.45	0.166	69.96	70.95
21	C18:1 (6t)	25.65	0.041	25.52	25.77	51	C20:5 (5c,8c,11c,14c,17c)	74.01	0.080	73.77	74.25
22	C18:1 (9t)	25.80	0.032	25.70	25.89	52	C24:0	81.75	0.358	80.67	82.82
23	C18:1 (11t)	25.97	0.035	25.87	26.08	53	C24:1 (15c)	91.89	0.271	91.07	92.70
24	C18:1 (6c)	26.38	0.033	26.28	26.48	54	C22:4 (7c,10c,13c,16c)	92.69	0.148	92.24	93.13
25	C18:1 (9c)	26.61	0.031	26.52	26.70	55	C22:5 (4c,7c,10c,13c,16c)	102.11	0.148	101.67	102.56
26	C18:1 (11c)	26.99	0.032	26.90	27.09	56	C22:5 (7c,10c,13c,16c,19c)	118.57	0.179	118.03	119.11
27	C18:2 (9t,12t)	29.15	0.032	29.06	29.25	57	C22:6 (4c,7c,10c,13c,16c,19c)	131.58	0.158	131.11	132.05
28	C18:2 (9c,12t)	30.20	0.065	30.01	30.40						
	C19:1 (7t)										
29	C18:2 (9t,12c)	30.64	0.045	30.51	30.78						
	C19:1 (10t)										
30	C18:2 (9c,12c)	31.38	0.031	31.29	31.48						

The retention time data for each fatty acid obtained by repeated analysis of standards for 7 days was used to calculate average and standard deviation.

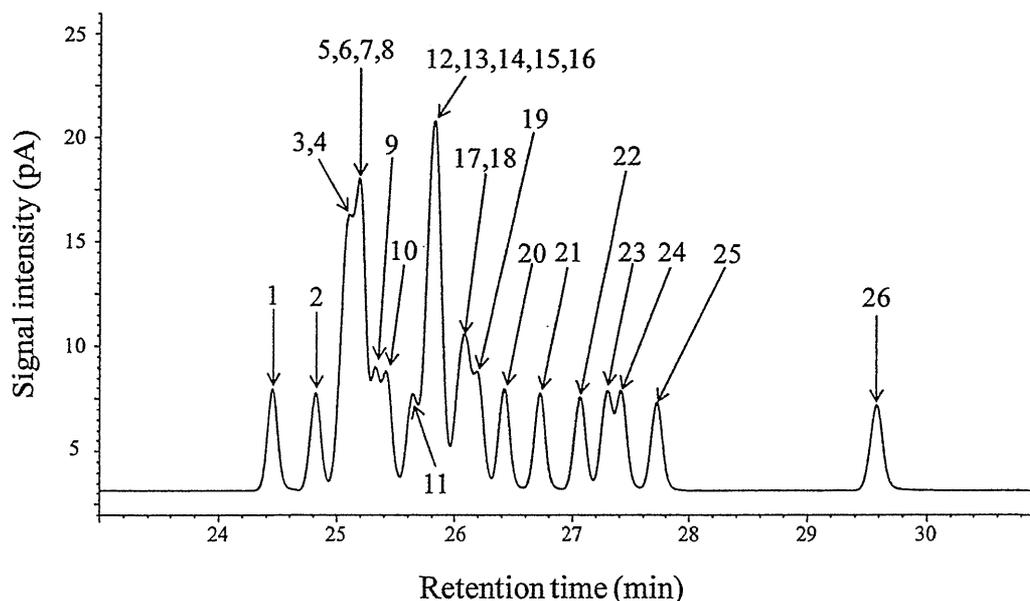


Fig. 2. Representative GC chromatograms of 26 kind of molecular species of C18:1 fatty acids

Peaks are numbered as follows: 1:C18:1 (4t), 2:C18:1 (5t), 3: C18:1 (6t), 4: C18:1 (7t), 5: C18:1 (8t), 6: C18:1 (4c), 7: C18:1 (5c), 8: C18:1 (9t), 9: C18:1 (10t), 10: C18:1 (11t), 11: C18:1 (12t), 12: C18:1 (7c), 13: C18:1 (13t), 14: C18:1 (6c), 15: C18:1 (14t), 16: C18:1 (8c), 17: C18:1 (9c), 18: C18:1 (15t), 19: C18:1 (10c), 20: C18:1 (11c), 21: C18:1 (12c), 22: C18:1 (13c), 23: C18:1 (16t), 24: C18:1 (14c), 25: C18:1 (15c), 26: C18:1 (16c).

分析において、食品種と濃度が目的にかなう適切な標準試料を入手できることは少ない。このため、本研究では、分析対象とする食品あるいはそれに類似の食品を均質化した試料に、特定のトランス脂肪酸分子種を添加し調製した試料（添加試料）を使用した。

種々のトランス脂肪酸分子種の分析過程における挙動が一致しており、それぞれの定量値に有意な差を生じる要因とならないならば、添加試料の調製には任意のトランス脂肪酸分子種を使用することが可能である。しかし、対象食品に成分として含まれている分子種を添加した場合には、食品中の存在量と添加量の合算量が定量値の期待値となるため、別途成分量を求め差し引く必要が生じる。この場合、解析対象となる値は、同一の分析法により得た2つの定量値の差であるため、真度および精度を適切に推定することは難しい。本研究で用いた食品試料の事前分析結果に基づき、また個々の分子種の挙動は一致していると仮定したうえで、購入可能であった標準試薬中5つのトランス脂肪酸分子種（C15:1 10t, C16:1 9t, C17:1 10t, C20:1 11t, C22:1 13t）を添加に用いた。

4) 添加濃度の決定

指針中には、「食品100gあたり（清涼飲料水等にあつては100mLあたり）のトランス脂肪酸の含有量が0.3g未満である場合には0gと表示しても差し支えない」とある。トランス脂肪酸を0.3g/100gの濃度で含む食品には、単一のトランス脂肪酸分子種が0.3g/100gの濃度で含まれている最も単純なものから、多数の分子種の量の和として0.3g/100gが含まれているものまで、さまざまな食品が想定される。個々のトランス脂肪酸分子種には一意に定まる明確な量がある。これを測定により知ろうとすれば、測定量となる。一方、実際の食品に含まれるトランス脂肪酸分子種の種類とその量比は一定ではないため、トランス脂肪酸量は一意には定まらない。分析法の真度と精度は、明確に定まる測定量に対し推定される。したがって、トランス脂肪酸分析法の性能は、個々のトランス脂肪酸分子種の定量値（測定量の推定値）に基づき推定、評価することしかできない。以上の情報および考察に基づき、食用油脂については、個々のトランス脂肪酸分子種を0.3g/100gの濃度で添加し調製した試料を、性能評価に使用した。また、この濃度の1/2もしくは2倍量が含まれていた場合の分析法の性能への影響も併せて評価し、性能基準値を検討するためのデータとした。またデニッシュペストリーの場合には、デニッシュペストリーの重量換算で、0.3g/100gを添加量の最大濃度とし、その約1/2量および1/5量について検討した。

3. 性能評価の結果

検討した性能評価手法を用いて得られた定量値を解析し、真度および精度を推定した（Table 4-1~4-5）。また、0.3g/100gの添加試料の分析結果から推定された真度と室内精度のプロットをFig. 3とFig. 4に示す。添加した各トランス脂肪酸分子種の定量値は、内部標準ごとに算出し

た。真度は添加濃度を真値として推定した。精度は、得られた定量値をデータセットとする一元配置の分散分析の結果から推定した。

結果を概観すると、食用油脂あるいはデニッシュペストリー、また各トランス脂肪酸分子種の添加濃度によらず、室内精度は相対標準偏差として2.5%未満、真度は90~110%であった（Table 4）。また、炭素数の大きな脂肪酸を内部標準とした場合ほど真度が低く推定される傾向が認められた。この傾向は、Fig. 3によって視覚的にも確認することができる。原因を明らかにするため、内部標準の炭素数の増加に伴い、得られる信号強度が大きくなることを確認した。FIDの検出原理として、一定量であっても炭素数の増加に応じて得られる信号強度が大きくなること（検出の感度が異なること）が知られている。これを補正する目的から、各トランス脂肪酸分子種の定量値を算出する際には、理論FID感度補正係数が用いられる。TAGの分解、遊離脂肪酸のメチル化やガスクロマトグラフによる分離など、その他の要因を否定することはできないが、内部標準脂肪酸の炭素数が大きいほど、理論FID感度補正係数が所期の目的を十分に果たしていない可能性が考えられる。

試料とトランス脂肪酸分子種との組み合わせに特徴的な結果として、以下の2点が観察された。大豆油を試料とした場合に、C17:1 (10t) の分析結果から推定される真度が、添加濃度によらず、その他のトランス脂肪酸分子種に比べ低い（Table 4-1）。この現象は、サフラワー油でも同様に観察されたが（Table 4-3）、残り3食品では観察されていない。またショートニングを試料とした場合に、C20:1 (11t) の分析結果から推定される精度は、他の食品とトランス脂肪酸分子種の組み合わせから推定される精度に比べ、わずかに大きな値となった（Table 4-4）。この結果は、内部標準とする脂肪酸分子種に依存しない（Fig. 4）。以上の結果は、食品種とトランス脂肪酸分子種との組み合わせが真度や精度に異なる影響を与える可能性を示唆している。

4. 性能基準値の検討

性能基準値には、分析目的の要求を満たし、かつ実行可能な値を設定しなければならない。トランス脂肪酸分析の目的は、表示内容の正当性を保証するのに適切な分析結果を得ることである。しかし、この目的に応じて合理的な値を設定するための情報は無い。そこで、Codex手続きマニュアルに示された「分析法の性能基準および規制に使用される分析法の評価に関する数値設定のためのガイドライン」（以下、ガイドライン）¹²⁾を分析法一般に設定される性能基準値の参考とし、さらに本研究で構築した分析法の性能評価結果を、実行可能性の根拠として、トランス脂肪酸分析法の性能基準値を検討した。

真度は、ガイドライン中に測定対象化学物質の濃度が0.1%以上1%未満の場合に、回収率を95~105%に設定する例が示されている。また、本研究により推定された真度

Table 4-1. Trueness, repeatability and reproducibility of the method for soybean oil samples

Internal standard		C11:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.4	1.7	100.0	0.5	0.9	99.8	0.7	0.8	101.0	
C16:1 (9t)	1.5	1.8	101.8	1.3	1.6	101.6	0.4	1.3	101.8	
C17:1 (10t)	1.6	2.1	98.1	0.5	1.0	98.9	0.9	1.1	97.3	
C20:1 (11t)	1.1	2.2	105.2	0.6	1.0	102.1	0.5	0.8	102.3	
C22:1 (13t)	1.6	1.6	100.2	0.8	0.9	99.4	0.9	1.1	100.5	

Table 4-1. (Continued)

Internal standard		C13:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.2	1.6	97.3	0.5	0.9	97.4	0.2	0.2	98.6	
C16:1 (9t)	1.5	1.8	99.0	1.1	1.5	99.1	0.5	0.8	99.4	
C17:1 (10t)	1.6	2.0	95.4	0.3	0.8	96.5	0.4	0.5	95.0	
C20:1 (11t)	0.9	2.1	102.3	0.5	0.8	99.6	0.2	0.3	99.9	
C22:1 (13t)	1.3	1.3	97.5	0.5	0.7	97.0	0.4	0.7	98.1	

Table 4-1. (Continued)

Internal standard		C17:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.2	1.7	93.8	0.6	1.0	94.0	0.2	0.3	95.1	
C16:1 (9t)	1.5	1.8	95.5	1.1	1.5	95.6	0.6	0.8	95.9	
C17:1 (10t)	1.6	2.1	92.0	0.3	0.9	93.1	0.3	0.5	91.6	
C20:1 (11t)	0.9	2.1	98.7	0.6	0.9	96.1	0.3	0.3	96.3	
C22:1 (13t)	1.3	1.3	94.0	0.4	0.8	93.5	0.4	0.7	94.6	

Table 4-1. (Continued)

Internal standard		C21:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.0	1.6	94.6	0.6	0.8	94.7	0.3	0.3	95.9	
C16:1 (9t)	1.7	1.8	96.3	1.3	1.4	96.5	0.5	0.6	96.6	
C17:1 (10t)	1.6	2.0	92.8	0.6	0.9	93.9	0.5	0.5	92.3	
C20:1 (11t)	0.8	2.0	99.5	0.6	0.9	96.9	0.3	0.3	97.1	
C22:1 (13t)	1.1	1.1	94.8	0.7	0.9	94.4	0.4	0.5	95.3	

RSDr: Repeatability, RSDr: Reproducibility within-laboratory

Table 4-2. Trueness, repeatability and reproducibility of the method for rape seed oil samples

Internal standard		C11:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	0.9	1.5	99.3	1.1	1.3	99.8	0.5	0.9	102.0	
C16:1 (9t)	1.3	1.3	100.2	1.1	1.1	101.3	0.3	0.4	103.1	
C17:1 (10t)	2.1	2.1	100.6	1.3	1.3	101.7	1	1.1	100.3	
C20:1 (11t)	0.7	1.2	99.5	1	1.1	99.3	0.7	0.7	101.6	
C22:1 (13t)	1.1	1.1	100.8	0.6	0.8	99.4	0.5	0.6	101.3	

Table 4-2. (Continued)

Internal standard		C13:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	0.7	1.5	96.8	0.7	1.1	97.4	0.4	0.7	99.4	
C16:1 (9t)	1.2	1.3	97.7	1.1	1.1	98.8	0.5	0.5	100.5	
C17:1 (10t)	2.0	2.1	98.1	1.0	1.3	99.2	0.8	0.9	97.8	
C20:1 (11t)	0.8	1.4	97.0	0.7	0.9	96.9	0.4	0.4	99.1	
C22:1 (13t)	1.1	1.3	98.3	0.6	0.7	96.9	0.3	0.5	98.8	

Table 4-2. (Continued)

Internal standard		C17:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	0.7	1.4	93.8	0.7	1.1	94.6	0.3	0.6	96.7	
C16:1 (9t)	1.2	1.3	94.7	1.0	1.0	96.0	0.5	0.6	97.7	
C17:1 (10t)	2.0	2.0	95.1	1.1	1.3	96.3	0.6	0.7	95.0	
C20:1 (11t)	0.8	1.4	94.1	0.7	1.0	94.1	0.4	0.4	96.3	
C22:1 (13t)	1.1	1.4	95.3	0.5	0.7	94.1	0.3	0.5	96.0	

Table 4-2. (Continued)

Internal standard		C21:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	0.6	1.4	94.0	0.6	1.0	94.8	0.2	0.7	97.0	
C16:1 (9t)	1.2	1.3	94.9	1.0	1.0	96.2	0.6	0.7	98.0	
C17:1 (10t)	2.0	2.0	95.3	1.2	1.4	96.6	0.8	0.8	95.4	
C20:1 (11t)	0.9	1.3	94.2	0.6	1.0	94.4	0.6	0.6	96.6	
C22:1 (13t)	1.3	1.4	95.5	0.6	0.7	94.4	0.4	0.7	96.3	

RSD_r: Repeatability, RSD_R: Reproducibility within laboratory

Table 4-3. Trueness, repeatability and reproducibility of the method for safflower oil samples

Internal standard		C11:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.7	1.8	97.2	1.0	1.4	99.1	0.3	0.9	99.6	
C16:1 (9t)	1.2	1.3	98.7	1.2	1.9	100.6	0.5	0.7	100.6	
C17:1 (10t)	0.9	1.5	95.5	0.7	1.4	98.1	0.5	0.9	96.3	
C20:1 (11t)	1.2	1.5	96.3	0.4	1.6	98.3	0.7	1.1	100.7	
C22:1 (13t)	1.9	2.0	98.6	1.2	1.8	98.7	0.6	1.1	99.2	

Table 4-3. (Continued)

Internal standard		C13:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.0	1.0	95.2	0.6	0.9	97.1	0.6	0.6	98.0	
C16:1 (9t)	1.3	1.3	96.7	0.7	1.3	98.6	0.8	0.8	99.1	
C17:1 (10t)	0.3	0.8	93.6	0.3	0.8	96.1	0.4	0.5	94.8	
C20:1 (11t)	1.1	1.1	94.3	0.9	1.5	96.3	0.5	0.7	99.1	
C22:1 (13t)	1.3	1.5	96.6	0.7	1.2	96.7	0.6	0.9	97.7	

Table 4-3. (Continued)

Internal standard		C17:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	0.9	1.0	92.4	0.6	1.0	94.4	0.6	0.7	95.3	
C16:1 (9t)	1.3	1.3	93.9	0.7	1.3	95.9	0.9	0.9	96.4	
C17:1 (10t)	0.3	0.8	90.9	0.3	0.8	93.5	0.4	0.5	92.2	
C20:1 (11t)	1.2	1.2	91.6	0.9	1.5	93.7	0.5	0.8	96.4	
C22:1 (13t)	1.3	1.4	93.8	0.7	1.2	94.0	0.7	1.0	95.0	

Table 4-3. (Continued)

Internal standard		C21:0								
Fortified level (g/100 g)		0.15			0.3			0.6		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	
C15:1 (10t)	1.0	1.1	92.3	0.6	1.1	94.3	0.6	0.8	95.3	
C16:1 (9t)	1.4	1.4	93.7	0.7	1.5	95.7	0.9	1	96.4	
C17:1 (10t)	0.5	1.0	90.7	0.2	1.0	93.3	0.4	0.7	92.2	
C20:1 (11t)	1.1	1.4	91.4	0.9	1.6	93.5	0.5	0.8	96.4	
C22:1 (13t)	1.3	1.5	93.6	0.7	1.4	93.9	0.7	1.1	95.0	

RSDr: Repeatability, RSDR: Reproducibility within laboratory

Table 4-4. Trueness, repeatability and reproducibility of the method for shortening samples

Internal standard		C11 : 0							
Fortified level (g/100 g)		0.15		0.3		0.6			
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)
C15 : 1 (10t)	1.3	1.4	97.9	0.4	1.3	100.5	0.6	1.1	101.5
C16 : 1 (9t)	1.4	1.6	100.2	0.6	1.1	103	0.5	1.1	102.6
C17 : 1 (10t)	1.3	1.6	96.3	1.1	1.5	99.9	1.7	1.9	98.7
C20 : 1 (11t)	1.1	1.1	96.1	0.7	3.3	98.7	2.0	2.1	101.5
C22 : 1 (13t)	1.7	2	98.7	0.9	1.6	100.4	0.5	1.7	101.1

Table 4-4. (Continued)

Internal standard		C13 : 0							
Fortified level (g/100 g)		0.15		0.3		0.6			
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)
C15 : 1 (10t)	0.9	0.9	95.6	0.2	0.8	97.8	0.5	0.6	98.9
C16 : 1 (9t)	1.1	1.1	97.9	0.5	0.6	100.2	0.9	1	100.1
C17 : 1 (10t)	0.9	0.9	94.1	0.7	1.0	97.2	1.6	1.6	96.1
C20 : 1 (11t)	1.3	1.3	93.9	0.6	2.8	96.0	1.9	2.1	98.9
C22 : 1 (13t)	1.7	2.0	98.7	0.9	1.6	100.4	0.5	1.7	101.1

Table 4-4. (Continued)

Internal standard		C17 : 0							
Fortified level (g/100 g)		0.15		0.3		0.6			
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)
C15 : 1 (10t)	1.0	1.0	92.0	0.3	0.7	94.3	0.6	0.6	95.5
C16 : 1 (9t)	1.1	1.1	94.2	0.5	0.5	96.6	0.9	0.9	96.6
C17 : 1 (10t)	0.9	0.9	90.6	0.6	0.9	93.7	1.1	1.1	92.3
C20 : 1 (11t)	1.3	1.3	90.4	0.6	2.6	92.6	1.9	2.1	95.4
C22 : 1 (13t)	1.4	1.4	92.9	0.6	1.0	94.2	0.6	0.9	95.1

Table 4-4. (Continued)

Internal standard		C21 : 0							
Fortified level (g/100 g)		0.15		0.3		0.6			
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Trueness (%)
C15 : 1 (10t)	0.9	0.9	92.4	0.3	0.7	94.5	0.6	0.6	95.8
C16 : 1 (9t)	1.0	1.0	94.6	0.5	0.6	96.8	1.0	1.0	96.9
C17 : 1 (10t)	0.8	0.8	90.9	0.7	0.9	93.9	1.7	1.7	93.1
C20 : 1 (11t)	1.2	1.2	90.7	0.7	2.6	92.8	2.0	2.1	95.7
C22 : 1 (13t)	1.3	1.3	93.2	0.6	1.0	94.4	0.6	0.8	95.4

RSD_r: Repeatability, RSD_R: Reproducibility within laboratory

Table 4-5. Trueness, repeatability and reproducibility of the method for Danish pastry samples

Internal standard			C11:0						
Fortified level (g/100 g)	0.06		0.12				0.3		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)
C15:1 (10t)	0.9	1.5	99.3	1.1	1.3	99.8	0.5	0.9	102.0
C16:1 (9t)	1.3	1.3	100.2	1.1	1.1	101.3	0.3	0.4	103.1
C17:1 (10t)	2.1	2.1	100.6	1.3	1.3	101.7	1.0	1.1	100.3
C20:1 (11t)	0.7	1.2	99.5	1.0	1.1	99.3	0.7	0.7	101.6
C22:1 (13t)	1.1	1.1	100.8	0.6	0.8	99.4	0.5	0.6	101.3

Table 4-5. (Continued)

Internal standard			C13:0						
Fortified level (g/100 g)	0.06		0.12				0.3		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)
C15:1 (10t)	0.7	1.5	96.8	0.7	1.1	97.4	0.4	0.7	99.4
C16:1 (9t)	1.2	1.3	97.7	1.1	1.1	98.8	0.5	0.5	100.5
C17:1 (10t)	2.0	2.1	98.1	1.0	1.3	99.2	0.8	0.9	97.8
C20:1 (11t)	0.8	1.4	97.0	0.7	0.9	96.9	0.4	0.4	99.1
C22:1 (13t)	1.1	1.3	98.3	0.6	0.7	96.9	0.3	0.5	98.8

Table 4-5. (Continued)

Internal standard			C17:0						
Fortified level (g/100 g)	0.06		0.12				0.3		
Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSDr (%)	Trueness (%)
C15:1 (10t)	0.7	1.4	93.8	0.7	1.1	94.6	0.3	0.6	96.7
C16:1 (9t)	1.2	1.3	94.7	1.0	1.0	96.0	0.5	0.6	97.7
C17:1 (10t)	2.0	2.0	95.1	1.1	1.3	96.3	0.6	0.7	95.0
C20:1 (11t)	0.8	1.4	94.1	0.7	1.0	94.1	0.4	0.4	96.3
C22:1 (13t)	1.1	1.4	95.3	0.5	0.7	94.1	0.3	0.5	96.0

RSDr: Repeatability, RSDr: Reproducibility within laboratory

は、全分析を通じて90.4~105.2%であった (Table 4)。これらを考慮し、90~110%を真度の評価基準値とすることが適当と考えられる。なお、0.3 g/100 gの濃度の各トランス脂肪酸分子種の分析結果に制限すれば、上記に比べより狭い範囲で真度は推定されている。

ガイドライン中には、Horwitz式¹³⁾により0.1~1%の濃度で予測される室間精度は相対標準偏差 (RSD%) として6~8%であることが例示されている。また予測室間精度に0.66を乗じた値を予測室内精度とすることが提案されている¹⁴⁾。一方、本研究で実施したすべての分析を

通じ、最大の室内精度は2.8%であった (Table 4)。したがって、予測室内精度を参照し、室内精度の評価基準値を5%に設定しても、余裕のある設定といえる。また、2.8%の室内精度は、C20:1 (11t) をショートニングに0.3 g/100 gの濃度で添加した試料の分析結果から推定されている。このときの平均値は0.29 g/100 g、標準偏差は0.008 g/100 gである。これらの値と χ^2 乗値を用いて、全定量値が構成要素となる仮想的母集団の標準偏差を推定すると (自由度4, 95%信頼水準)、相対標準偏差として約8%となる。これを丸めた10%を室内精度の基準値とする

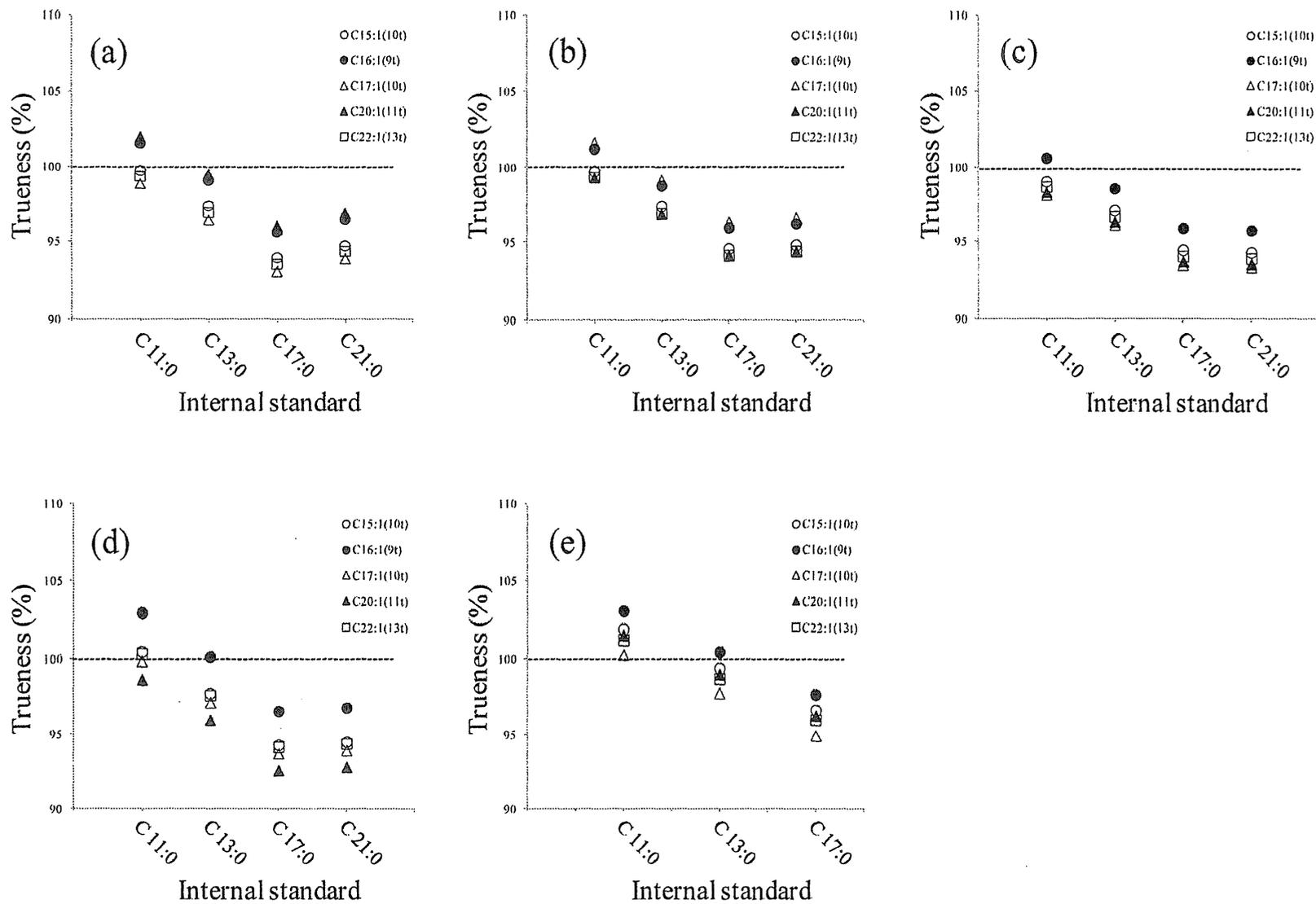


Fig. 3. Trueness of the methods for (a) soy bean oil, (b) rape seed oil, (c) safflower oil, (d) shortening, (e) Danish pastry

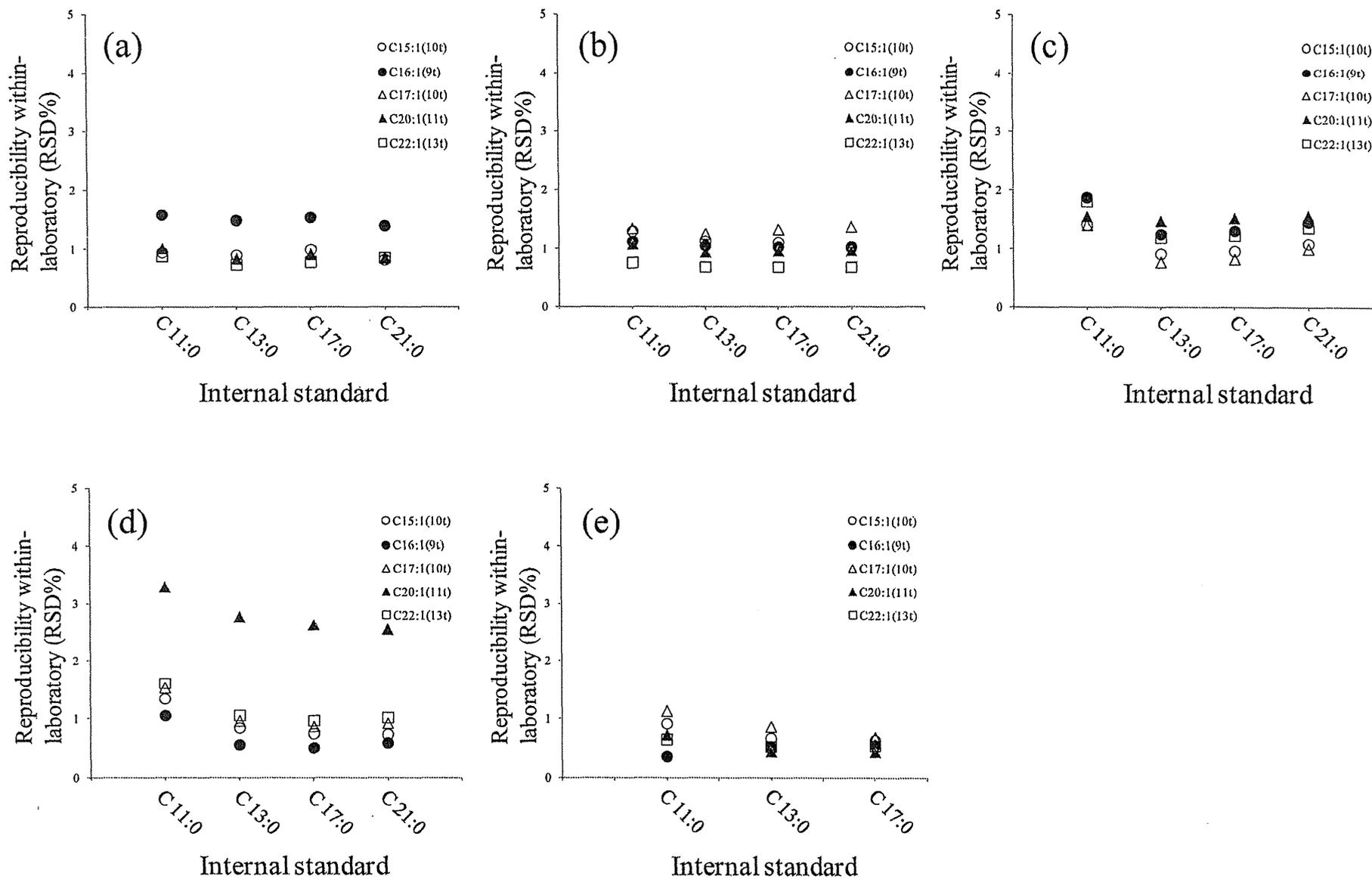


Fig. 4. Reproducibility of the methods for (a) soy bean oil, (b) rape seed oil, (c) safflower oil, (d) shortening, (e) Danish pastry

Table 5. *trans*-Fatty acid contents in soybean oil, rape seed oil, safflower oil, shortening, and Danish pastry samples

Sample	Molecular species of <i>trans</i> -fatty acid	Results		
		Average (g/100 g)	S.D.	RSD%
Soybean oil	C18 : 2 (9c, 12t)	0.40	0.004	0.9
	C18 : 2 (9t, 12c)	0.36	0.008	2.2
	C18 : 3 (9t, 12t, 15c)/C18 : 3 (9t, 12c, 15t)	0.08	0.004	4.5
	C18 : 3 (9c, 12c, 15t)/C18 : 3 (9c, 12t, 15t)	0.64	0.006	0.9
	C18 : 3 (9c, 12t, 15c)	0.11	0.008	8.6
	C18 : 3 (9t, 12c, 15c)	0.58	0.008	1.5
	Content of <i>trans</i> -fatty acids	2.15	0.021	1.0
Rape seed oil	C18 : 2 (9c, 12t)	0.02	0.001	2.9
	C18 : 3 (9c, 12c, 15t)/C18 : 3 (9c, 12t, 15t)	0.05	0.001	1.9
	Content of <i>trans</i> -fatty acids	0.07	0.001	2.1
Safflower oil	C18 : 2 (9c, 12t)	0.02	0.002	6.3
	C18 : 3 (9t, 12c, 15c)	0.02	0.002	9.5
	Content of <i>trans</i> -fatty acids	0.04	0.003	6.2
Shortening	C18 : 1 (9t)	0.11	0.005	5.0
	C18 : 2 (9c, 12t)	0.13	0.004	3.2
	C18 : 2 (9t, 12c)	0.11	0.005	4.0
	C18 : 3 (9c, 12c, 15t)/C18 : 3 (9c, 12t, 15t)	0.08	0.002	1.9
	C18 : 3 (9t, 12c, 15c)	0.08	0.005	6.4
	Content of <i>trans</i> -fatty acids	0.51	0.014	2.8
Danish pastry	C18 : 1 (6t)	0.05	0.005	11.5
	C18 : 1 (9t)	0.07	0.004	6.5
	C18 : 1 (11t)	0.15	0.002	1.1
	C18 : 2 (9c, 12t)	0.02	0.001	2.6
	C18 : 2 (9t, 12c)	0.02	0.001	3.4
	C18 : 3 (9c, 12c, 15t)/C18 : 3 (9c, 12t, 15t)	0.02	0.000	2.0
	C18 : 3 (9t, 12c, 15c)	0.02	0.001	5.9
	Content of <i>trans</i> -fatty acids	0.35	0.005	1.4

Content of *trans*-fatty acids is the sum of contents for each *trans*-fatty acid molecular species.

ことも考えられる。

5. 食品に含まれるトランス脂肪酸の分析結果

性能評価のための実験計画に従い、添加試料の調製に使用した試料（未添加試料）を分析した。大豆油およびデニッシュペストリーの添加ならびに、未添加試料から得た代表的なクロマトグラムをFig.5に示す。また、未添加試料に含まれていたトランス脂肪酸分子種を同定し、定量した結果をTable 5に示す。クロマトグラムからは、添加した各種脂肪酸分子種と食品に含まれていた脂肪酸分子種との分離を確認することができる。

トランス脂肪酸定量値のばらつきは、含有量の少ない一部のトランス脂肪酸分子種の定量値のばらつきに比べ、小さい (Table 5)。独立に分布する複数の定量値の和の分散は、個々の定量値の分散のうち大きな値により支配的な影響を受ける。この原理どおり、トランス脂肪酸定量値のばらつきも、より多く含まれているトランス脂肪酸分子種の定量値のばらつきの影響を強く受けることが示された。極微量なトランス脂肪酸分子種の含有を見逃さないためには、より定量限界の低い分析法を用いる必要もある。

大豆油試料の分析結果からは、2 g/100 gを超える比較的多量のトランス脂肪酸が含まれていることが明らかになった。しかし、この大豆油製品には、トランス脂肪酸を含まない旨の表示がされていた。一般にトランス脂肪酸として強く認識されているエライジン酸 (C18 : 1 9t) とバクセン酸 (C18 : 1 11t) は検出されなかったことから、それら特定のトランス脂肪酸分子種の分析結果にのみ基づき表示がされたのではと疑われる。測定対象が明示されていないことを原因とする、不適切な表示の一例と言えるだろう。

ま と め

トランス脂肪酸表示を目的とした、食用油脂と一般食品分析のための一例となる方法を構築した。また、同じ目的で使用される分析法の性能を明らかにするための手法と、満たすべき性能基準値について検討した。性能基準値を満たす分析法は、使用する内部標準によることなく、表示やその検証を目的として、食用油脂および一般食品中のトランス脂肪酸量を知るための分析法として使用可能と考えら