

内閣府食品安全委員会
平成 21 年度食品安全確保総合調査

食品中でのヘテロサイクリックアミンの
含有実態調査報告書

平成 22 年 3 月

財団法人 日本食品分析センター

目 次

	ページ
1 調査目的	1
2 調査実施場所	3
3 調査検討会	3
4 調査内容	3
5 調査結果の概要	4
6 調査結果	6
6.1 HCA 分析法の確立及び妥当性確認	6
1) 分析法フローチャート	6
2) 分析法(詳細)	7
3) 分析法の妥当性検証	11
6.2 トータルダイエツト試料(TDS)の調製及び分析	25
6.3 市販食品の調査結果	28
6.4 調理の影響調査	30
7 まとめ	32
8 参考資料	33
8.1 検量線及びクロマトグラム例	33
8.2 用語の解説	41
別添-1 トータルダイエツト試料の調製法	1~6
別添-2 調理した検体の写真	1~4

食品中でのヘテロサイクリックアミンの含有実態調査報告書

1 調査目的

ヘテロサイクリックアミン(以下、「HCA類」と略す。)は、タンパク質及びアミノ酸を多く含む食品を150℃以上の温度で調理したとき生成し、これまでに20種以上のHCA類の存在が確認されている。国際がん研究機関(IARC)では、このうちの10種に発がん性があるとしており、2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-*f*]キノリン(IQ)がグループ2A(ヒトに対しておそらく発がん性がある)、その他9種の物質が2B(ヒトに対して発がん性の可能性がある)に分類されている。

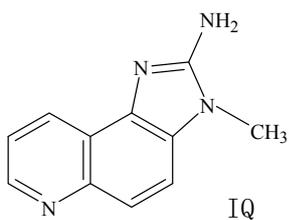
食品中の含有実態については、これまでも、燻製食品や調理した食品など、含有が予想される食品を中心に、発がん性のある10種のHCA類のいくつかについての調査がしばしば行われている。これらの調査において、食品中におけるHCA類の存在量は、一般に0.1~数 ng/gと極めて低濃度であると報告されている。

本調査では、国内における食品中のHCA類含有量についての実態を把握するために、発がん性が指摘されている10種のHCA類の各種食品に適用できる微量分析法を確立し、その分析法を用いてトータルダイエツト試料(以下、「TDS試料」と略す。)及び調理加工食品中に含まれるHCA類を測定し、その国内での存在実態を明らかにした。

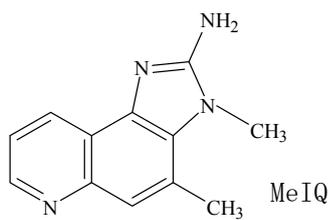
対象とするHCA類は、以下の10種とした(括弧内は通常使用される略号)。

- 1) 2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-*f*]キノリン(IQ)
- 2) 2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ[4,5-*f*]キノリン(MeIQ)
- 3) 2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ[4,5-*f*]キノキサリン(MeIQx)
- 4) 2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン(PhIP)
- 5) 3-アミノ-1,4-ジメチル-5*H*-ピリド[4,3-*b*]インドール(Trp-P-1)
- 6) 3-アミノ-1-メチル-5*H*-ピリド[4,3-*b*]インドール(Trp-P-2)
- 7) 2-アミノ-9*H*-ピリド[2,3-*b*]インドール(A α C)
- 8) 2-アミノ-3-メチル-9*H*-ピリド[2,3-*b*]インドール(MeA α C)
- 9) 2-アミノ-6-メチルジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾール(Glu-P-1)
- 10) 2-アミノジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾール(Glu-P-2)

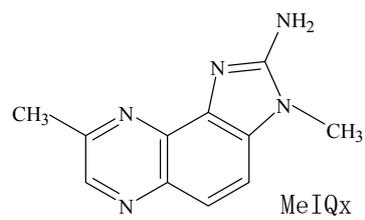
対象物質の構造式と分子量を以下に示した。



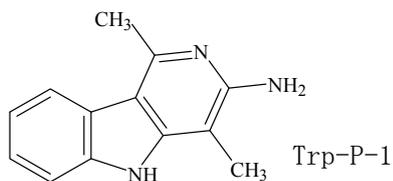
組成式：C₁₁H₁₀N₄
分子量：198.2



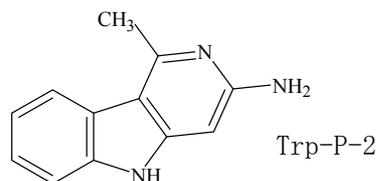
組成式：C₁₂H₁₂N₄
分子量：212.3



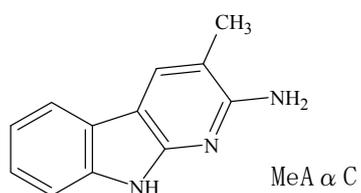
組成式：C₁₁H₁₁N₅
分子量：213.2



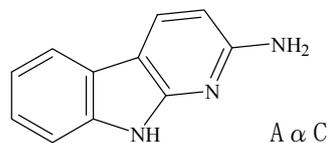
組成式：C₁₃H₁₃N₃
分子量：211.3



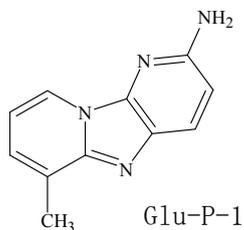
組成式：C₁₂H₁₁N₃
分子量：197.4



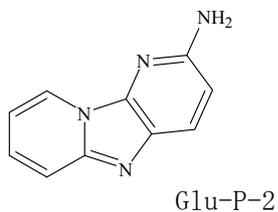
組成式：C₁₂H₁₁N₃
分子量：197.2



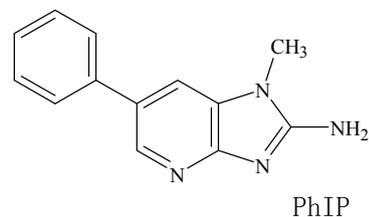
組成式：C₁₁H₉N₃
分子量：183.2



組成式：C₁₁H₁₀N₄
分子量：198.3



組成式：C₁₀H₈N₄
分子量：184.3



組成式：C₁₃H₁₂N₄
分子量：224.3

2 調査実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
東京都多摩市永山6丁目11番10号

3 調査検討会

本調査に関して3回の検討会及び報告会を開催した。

なお、検討委員は次に示す4名とした(括弧内は所属、敬称略)。

- ・ 片岡 洋行(座長；就実大学薬学部薬学科応用分析化学教授)
- ・ 松田 りえ子(国立医薬品食品衛生研究所 食品部長)
- ・ 吉田 充(独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 食品分析研究領域長)
- ・ 戸塚 ゆ加里(国立がんセンター研究所がん予防基礎研究プロジェクト室長)

① 第1回検討会 (開催年月日：平成21年7月9日)

調査に先立ち、調査内容についての調査検討会を開催し、本調査はこの検討会での意見に基づいて実施した。

② 第2回検討会 (開催年月日：平成21年12月21日)

調査の中間報告会として開催し、それまでの経過を確認するとともに、その後の予定について検討委員の了解を得た。

③ 第3回検討会 (開催年月日：平成22年3月19日)

調査の最終結果を報告し、まとめ方について議論した。

④ 報告会(開催年月日：平成22年3月26日)

調査結果の報告を行った。

4 調査内容

4.1 分析法の開発

食品中に存在するHCA類は微量であるため、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(以下、「LC/MS/MS」と略す。)を用いた微量分析法を開発した。開発した分析法について、妥当性の検証(単一試験所)を行った。

4.2 トータルダイエット試料の調製と分析

おおよその汚染実態を把握するために、TDS試料(平成18年度 国民健康・栄養調査の摂取量に基づく)の14群(別添-1)を調製し、HCA類含有量を調査した。

4.3 市販食品の調査

HCA類の含有が予想される食品(惣菜)を購入し、それらに含まれるHCA類含有量を調査した。なお、市販食品の選定にあたり惣菜白書(2009年版社団法人 日本惣菜協会)における購入頻度調査上位のものを優先した。

4.4 調理の影響

肉及び魚について、調理法の異なる(ホットプレート、直火焼き、フライ)試料を調製し、HCA類生成量に及ぼす調理の影響を調査した。

5 調査結果の概要

5.1 HCA分析法の確立及び妥当性確認

食品中の HCA 類を酸性メタノールで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム及び固相カートリッジカラムで精製し、LC/MS/MS で定量する方法を確立した。本分析法では、安定同位体標識化合物を内標準物質として使用し、分析操作中の対象物質の損失等を補正するとともに、精度管理の指標としたが、Glu-P-1 及び Glu-P-2 については、安定同位体標識化合物が入手困難であったことから、絶対検量線法を採用した。また、対象とした 10 種 HCA 類のうち、PhIP が陰イオン交換カラムで他と異なる挙動を示したため、他の HCA 類とは一部異なる前処理操作を行った。

確立した分析法を用いて TDS 試料について添加回収試験を実施したところ、各食品群により回収率に差が認められたが、10 ng/g 添加で Glu-P-1 及び Glu-P-2 を除いた HCA 類の平均回収率は 35%(8 群:Trp-P-1)~165%(10 群:MeA α C)であった。また、Glu-P-1 及び Glu-P-2 については、内標準物質での補正を行わないことから、それぞれ 24~77%、18~75%と低い値であった。

1 ng/g を添加した試料における定量値のバラツキから算出した定量限界を、4 群の油脂試料(1 g 採取)及び 11 群の肉類・卵類試料を用いて確認した。その結果、標準偏差の 10 倍濃度とした場合の定量限界は、油脂試料では 0.7~3.2 ng/g、その他の食品群では 1.1~14 ng/g であった。

また、10 ng/g を添加した試料における精度(相対標準偏差)は、油脂試料(1 g 採取)で併行精度 3.6~9.4%、室内精度 5.0~20.7%で、その他の試料で併行精度 5.1~23.7%、室内精度 6.5~23.7%であった。

5.2 TDS 試料の分析結果

TDS 試料 14 群のいずれからも HCA は検出されなかった(検出限界未満)。

5.3 市販食品(惣菜)の分析結果

市販食品 31 検体を分析した結果、焼き鳥 1 検体から A α C が 4.6 ng/g、削りぶし 2 検体から MeIQx が定量限界未満の痕跡量及び 1.9 ng/g 検出されたのみであった。

5.4 調理の影響

調理(加熱)による HCA 類の生成量を調査するため、肉類、魚介類について、調理条件を変えて生成する HCA 類の生成量を調べた。調査に供する試料として、一般に広く流通し、比較的均質な素材を入手しやすい豚肉(ステーキ用)及びブリの切り身を用いた。また、調理法は焼き具合、油や香辛料添加の有無を考慮し、ホットプレートによる調理法で 8 検体、フィッシュロースターによる調理法で 2 検体、直火による調理法で 6 検体、フライによる調理法で 6 検体の計 22 検体とした。

各種調理法により調製した検体を分析した結果、ホットプレート調理した検体では、

豚肉を油を用いて強めに焼いた検体から MeIQx が 1.4 ng/g、PhIP が 4.0 ng/g 検出された。直火で調理した場合、豚肉から MeIQx が 1.4~1.9 ng/g、MeA α C が 2.4~8.0 ng/g、A α C が 9.3~68 ng/g 検出され、PhIP は 13~120 ng/g 検出された。ブリから IQ が 2.0 ng/g、MeA α C が 4.4 ng/g、A α C が 8.2~33 ng/g 検出され、PhIP は 3.7 ng/g 検出された。これ以外の HCA 類はいずれからも検出されなかった。フィッシュロースター調理やフライ調理した検体からは、HCA 類は検出されなかった。

今回の調査結果から調理法ごとの痕跡量も含めた HCA 類の検出率をみると、まず、調理法による検出率では、ホットプレート調理が 8 検体 10 項目で、2/80(2.5%)、フィッシュロースターが 2 検体で 0/20(0%)、直火調理は、6 検体で 25/60(42%)であった。また、フライ調理では、6 検体で 0/60(0%)であった。予想していたように、直火調理による生成が顕著であった。

一方、HCA 物質ごとの検出頻度では、IQ : 1/22(4.5%)、MeIQx : 6/22(27%)、Trp-P-1 : 2/22(9.1%)、MeA α C : 6/22(27%)、A α C : 6/22(27%)、PhIP : 6/22(27%)であり、MeIQ、Trp-P-2、Glu-P-1 及び Glu-P-2 はいずれの調理からも検出されなかった。最大濃度は、豚肉を強めに直火調理したときの PhIP で 120 ng/g であった。

調理による試験全体での検出率は、27/220(12%)であった。

6 調査結果

6.1 HCA 類分析法の確立及び妥当性確認

以下の分析法を確立した。

1) 分析法フローチャート

試料 5 g または 1 g

内標準物質添加
0.1 mol/L 塩酸水 5 mL 及びメタノール 45 mL
油脂試料のみ、ヘキサン 50 mL

ホモジナイズまたは振とう抽出

遠心分離 (2,500 r/min、5 分)

上澄み分取 (油脂試料の場合、水層分取)

1 mol/L 塩酸水 5 mL 及びメタノール 45 mL

振とう抽出 (10 分)

遠心分離 (2,500 r/min、5 分)

上澄み分取 (油脂試料の場合、水層分取)

減圧濃縮 (50°C、5 mL 位まで)

1 mol/L NaOH 1 mL を加えアルカリ性確認 (pH 10 以上)

多孔性ケイソウ土カラム (K-Solute) へ負荷 (水約 5 mL で洗いこみ) 5 分放置

PSA を連結 (ジクロロメタン 5 mL で予備洗浄)

ジクロロメタン 100 mL 溶出

(PhIP 以外) (PhIP)

ジクロロメタンを減圧濃縮乾固

メタノール-酢酸 10 mL に溶解

SCX 負荷 (メタノール-酢酸 10 mL 予洗)

アセトン 15 mL 洗浄
メタノール 5 mL 洗浄

メタノール-アンモニア水 15 mL 溶出

減圧濃縮乾固

メタノール 5 mL または 1 mL に溶解

LC/MS/MS 注入 (HCA 画分)

PSA をはずし、窒素乾燥

SCX 連結 (メタノール-酢酸 10 mL 予洗)

メタノール-酢酸 15 mL で PhIP を PSA から溶出すると同時に SCX へ負荷

PSA をはずす

アセトン 15 mL 洗浄
メタノール 5 mL 洗浄

メタノール-アンモニア水 15 mL 溶出

減圧濃縮乾固

メタノール 5 mL または 1 mL に溶解

LC/MS/MS 注入 (PhIP 画分)

2) 分析法(詳細)

① 器具及び装置

遠心管(100 mL容、50 mL容)
メスフラスコ(20 mL容、50 mL容、100 mL容)
ナスフラスコ(200 mL容、300 mL容)
ピペット類
メスシリンダー
リザーバー及びジョイント
ヒスコトン型ホモジナイザー
振とう機
遠心分離機
吸引マニキュホールド
汎用天秤
ロータリーエバポレーター
液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計

② 標準品、内標準物質、試薬及び試液

標準品

IQ(純度：100%)、MeIQ(純度：100%)、MeIQx(純度：99.6%)、
MeA α C(酢酸塩、純度：99.5%)、PhIP(塩酸塩、純度：100%)、

Trp-P-1(酢酸塩、純度：97.4%)、Trp-P-2(酢酸塩、純度：99.6%)標準品[和光純薬工業株式会社]

A α C(純度：98.0%)、Glu-P-1(塩酸塩、純度：98.0%)、

Glu-P-2(塩酸塩、純度：98.0%)標準品[Toronto Research Chemicals Inc]

内標準物質(サロゲート物質)

MeIQx-d₃、PhIP-d₃、A α C-¹⁵N₃、Trp-P-2-¹³C₂, ¹⁵N 酢酸塩標準品[Toronto Research Chemicals Inc]

試薬及び試液

水(Milli Qで調製したもの)

メタノール(残留農薬・PCB試験用、HPLC用)[和光純薬工業株式会社]

アセトニトリル(HPLC用)[和光純薬工業株式会社]

ヘキサン(残留農薬・PCB試験用)[和光純薬工業株式会社]

ジクロロメタン(残留農薬・PCB試験用)[関東化学株式会社]

アセトン(残留農薬・PCB試験用)[和光純薬工業株式会社]

35%塩酸(試薬特級)[小宗化学薬品株式会社、和光純薬工業株式会社]

酢酸(試薬特級)[小宗化学薬品株式会社]

ギ酸(試薬特級)[関東化学株式会社]

水酸化ナトリウム(試薬特級)[関東化学株式会社]

28%アンモニア水(試薬特級)[小宗化学薬品株式会社]

ギ酸アンモニウム(試薬特級)[和光純薬工業株式会社]

陽イオン交換カートリッジカラム(Bond Elut JR-SCX、500 mg/3 mL)[Varian 社]

陰イオン交換カートリッジカラム(Bond Elut PSA、500 mg/3 mL)[Varian 社]

多孔性ケイソウ土カラム(InertSep K-Solute、20 mL)[ジーエルサイエンス社]

0.1 mol/L 塩酸：濃塩酸 10 mL を水 990 mL に混合した。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 20 g を水 500 mL に溶解した。

メタノール及び酢酸の混液(95:5)：メタノール 950 mL と酢酸 50 mL を混合した。

メタノール及びアンモニア水の混液(95:5)：メタノール 950 mL とアンモニア水 50 mL を混合した。

0.1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液：ギ酸アンモニウム 6.3 g を水 1 L に溶解した。

7.5 mmol/L(pH2.8)ギ酸アンモニウム溶液：0.1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 75 mL、ギ酸 2 mL 及び水を加え 1 L とした。

③ 標準溶液の調製

HCA 類の各標準品をメタノール(HPLC 用)に溶解し、標準原液を調製した。各標準原液を適宜希釈混合し、10 mg/L の混合標準溶液を調製した。

④ 内標準溶液の調製

各内標準物質をメタノール(HPLC 用)に溶解し内標準原液を調製した。各内標準原液を適宜希釈混合し、2 mg/L の混合内標準溶液を調製した。また、これをメタノール(HPLC 用)で希釈し、0.2 mg/L 及び 0.02 mg/L の添加用内標準溶液を調製した。

⑤ 定量用標準溶液の調製

混合標準溶液を適宜希釈し、混合内標準溶液(2 mg/L)2 mL を加え、メタノール(HPLC 用)で 20 mL に定容した。各溶液は、HCA 類として 0.0001~0.4 mg/L、内標準として 0.02 mg/L に相当する。

⑥ 試験溶液の調製

a. 通常試料(TDS4 群以外の試料)

試料5 gまたは1 gを採取し、内標準物質(MeIQx-d₃、PhIP-d₃、AαC-¹⁵N₃、Trp-P-2-¹³C₂、¹⁵N)各0.1 μg(1 gの時は0.02 μg)を添加し、0.1 mol/L塩酸5 mL及びメタノール45 mLを加えてホモジナイズまたは振とう抽出を行った。2,500 r/minで5分間遠心分離し、上澄み液を分取した。残渣に再度0.1 mol/L塩酸5 mL及びメタノール45 mLを加えて振とう抽出後、同様に遠心分離し、上澄み液をあわせて抽出液とした。この液を50℃以下で5 mL位まで減圧濃縮し、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLを加えた後、多孔性ケイソウ土カラム(InertSep K-Solute)に負荷した。容器を水5 mLで洗浄し、負荷した。5分放置後、あらかじめジクロロメタン5 mLで洗浄した陰イオン交換カートリッジカラム(PSA)をK-Soluteに連結しジクロロメタン100 mLで溶出した。この時、PSAにPhIP及びPhIP-d₃が保持され、それ以外のHCA類はジクロロメタンに溶出する。このジ

クロロメタン溶出液を40℃以下で減圧濃縮し窒素乾固後、メタノール及び酢酸の混液(95:5)10 mLに溶解しPhIP以外のHCA試料液とした。また、PhIPについては、PSAカートリッジカラムを窒素通気で乾燥後、メタノール及び酢酸の混液(95:5)15 mLで溶出しPhIP試料液とした。

あらかじめメタノール及び酢酸の混液(95:5)10 mLで洗浄した陽イオン交換(SCX)カートリッジカラムに、PhIP以外のHCA試料液及びPhIP試料液を負荷した(別々のカートリッジカラムに負荷させ以後の処理を各々行う)。流出液を捨てた後、試料溶液の入っていた容器をアセトン15 mLで洗浄し、洗浄液をカートリッジカラムに加えて流出させ、次にメタノール5 mLをカートリッジカラムに加えて流出させた。このアセトン洗浄液とメタノール流出液はいずれも捨てた。メタノール及びアンモニア水の混液(95:5)15 mLをカートリッジカラムに流してHCA類を溶出させた。溶出液を40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。

残留物にメタノール(HPLC用)5 mL(試料採取量1 gの場合は1 mL)加えて溶解し、これをHCA試験溶液(PhIP以外)及びPhIP試験溶液とした。

b. 油脂試料(TDS4 群のみ)

試料1 gを採取し、内標準物質(MeIQx-d₃、PhIP-d₃、AαC-¹⁵N₃、Trp-P-2-¹³C₂, ¹⁵N)各0.02 μgを添加し、0.1 mol/L塩酸5 mL及びメタノール45 mLを加えて振とう混和後、ヘキサン50 mLを加え振とうし、ヘキサン洗浄を行った。静置後下層を分取し、再度ヘキサン50 mLを加え振とうを行った。静置後下層を分取し抽出液とした。以下、通常試料と同様に操作した。

⑦ 定量

a. LC/MS/MS 操作条件

機種：API 4000[Applied Biosystems]

カラム：Discovery HS F5, φ2.1 mm×150 mm, 3 μm[シグマアルドリッチ]

カラム温度：40℃

移動相：A液 7.5 mmol/Lギ酸アンモニウム(pH2.8), B液 アセトニトリル

グラジエント B% : 80%→10 min→5%

流量：0.2 mL/min

注入量：2 μL

イオン化法：ESI positive

乾燥ガス温度：700℃

イオン化電圧：5,500 V

DP電圧：56 V

カーテンガス：窒素 30 psig

ネブライザーガス：窒素 40 psig

乾燥ガス：窒素 60 psig

コリジョンガス：窒素

コリジョンエネルギー(CE)及び設定質量数：表-1に示した。

表-1 各物質の設定質量数、コリジョンエネルギー

測定対象物質	定量用 (m/z)		確認用 (m/z)	
	設定質量数 (Q1→Q3)	CE (eV)	設定質量数 (Q1→Q3)	CE (eV)
IQ	198.9→184.1	37	198.9→156.9	47
MeIQ	213.1→197.9	37	213.1→170.0	53
MeIQx	214.0→146.3	45	214.0→131.0	45
Trp-P-1	212.1→195.0	35	212.1→168.1	41
Trp-P-2	197.9→181.4	37	197.9→127.0	59
MeAαC	197.9→129.0	39	197.9→181.1	35
AαC	183.9→139.9	45	183.9→166.9	35
Glu-P-1	198.9→110.0	45	198.9→92.0	61
Glu-P-2	185.0→130.9	41	185.0→157.8	35
PhIP	225.0→140.1	69	225.0→210.1	43
MeIQ _x -d ₃	217.2→198.9	37	-	-
Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	201.0→183.0	35	-	-
AαC- ¹⁵ N ₃	187.0→141.0	47	-	-
PhIP-d ₃	229.1→141.0	65	-	-

注) 定量用イオンを用いて定量計算し、HCA 類が検出された場合、確認用イオンで存在が確かであることを確認した。

b. 測定

定量用標準溶液及び試験溶液2 μLをLC/MS/MSに注入した。IQ、MeIQ及びMeIQxについてはMeIQ_x-d₃、Trp-P-1及びTrp-P-2についてはTrp-P-2-¹³C₂, ¹⁵N、MeAαC及びAαCについてはAαC-¹⁵N₃、PhIPについてはPhIP-d₃をそれぞれ内標準物質として用い、各HCA類と対応する内標準物質とのピーク面積比及び各HCA類濃度により検量線を作成した。Glu-P-1及びGlu-P-2については、絶対検量線法を採用した。試験溶液も同様に、各HCA類と対応する内標準物質とのピーク面積比を測定し、検量線を用いて試験溶液中の濃度を求め、次式から試料中のHCA類濃度を算出した。

(試料採取量5 gの場合)

$$\text{試料中の HCA 類濃度 (ng/g)} = \frac{\text{試験溶液中の濃度 (mg/L)} \times \frac{\text{最終液量 5 mL}}{\text{試料採取量 5 g}} \times 1000$$

(試料採取量1 gの場合)

$$\text{試料中の HCA 類濃度 (ng/g)} = \frac{\text{試験溶液中の濃度 (mg/L)} \times \frac{\text{最終液量 1 mL}}{\text{試料採取量 1 g}} \times 1000$$

3) 分析法の妥当性検証

① 添加回収試験(真度の確認)

TDS 試料の 14 群それぞれに、HCA 類を 10 ng/g 添加し試験溶液の調製に従って操作し、回収率を求めた。試行 2 回で行った。結果を表-2-1~2-14 に示した。なお、内標準物質を「内標」と略して表記した。

表-2-1 添加回収試験結果(1 群：米加工品, 5 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1 回目	2 回目		
IQ	82	85	84	MeIQ _x -d ₃ 71
MeIQ	81	89	85	
MeIQ _x	95	95	95	
Trp-P-1	92	89	91	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 61
Trp-P-2	92	82	87	
MeAαC	92	76	84	AαC- ¹⁵ N ₃ 82
AαC	98	86	92	
Glu-P-1	62	56	59	-
Glu-P-2	64	62	63	-
PhIP	93	110	102	PhIP-d ₃ 71

平均回収率：59% (Glu-P-1)~102% (PhIP), - ; 内標使用せず

表-2-2 添加回収試験結果(2 群：米以外の穀類, 5 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1 回目	2 回目		
IQ	89	93	91	MeIQ _x -d ₃ 68
MeIQ	98	99	99	
MeIQ _x	92	97	95	
Trp-P-1	116	101	109	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 50
Trp-P-2	124	88	106	
MeAαC	77	85	81	AαC- ¹⁵ N ₃ 74
AαC	89	92	91	
Glu-P-1	48	27	38	-
Glu-P-2	50	28	39	-
PhIP	99	90	95	PhIP-d ₃ 63

平均回収率：38% (Glu-P-1)~109% (Trp-P-1), - ; 内標使用せず

表-2-3 添加回収試験結果(3群：砂糖・菓子類，5g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	94	102	98	MeIQ _x -d ₃ 62
MeIQ	110	78	94	
MeIQ _x	107	93	100	
Trp-P-1	96	111	104	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 51
Trp-P-2	90	100	95	
MeA α C	90	80	85	A α C- ¹⁵ N ₃ 79
A α C	93	94	94	
Glu-P-1	24	47	36	-
Glu-P-2	25	60	43	-
PhIP	93	98	96	PhIP-d ₃ 81

平均回収率：36% (Glu-P-1)～104% (Trp-P-1)， - ；内標使用せず

表-2-4 添加回収試験結果(4群：油脂類，1g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	93	89	91	MeIQ _x -d ₃ 59
MeIQ	96	100	98	
MeIQ _x	101	107	104	
Trp-P-1	115	126	121	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 64
Trp-P-2	97	103	100	
MeA α C	126	156	141	A α C- ¹⁵ N ₃ 34
A α C	97	112	105	
Glu-P-1	70	73	72	-
Glu-P-2	67	70	69	-
PhIP	87	103	95	PhIP-d ₃ 49

平均回収率：69% (Glu-P-2)～141% (MeA α C)， - ；内標使用せず

表-2-5 添加回収試験結果(5群：豆類・豆類加工品, 5 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	115	111	113	MeIQ _x -d ₃ 47
MeIQ	115	91	103	
MeIQ _x	99	98	99	
Trp-P-1	100	112	106	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 54
Trp-P-2	97	94	96	
MeAαC	91	81	86	AαC- ¹⁵ N ₃ 66
AαC	87	81	84	
Glu-P-1	45	50	48	-
Glu-P-2	59	59	59	-
PhIP	109	101	105	PhIP-d ₃ 52

平均回収率：48% (Glu-P-1)～113% (IQ), - ; 内標使用せず

表-2-6 添加回収試験結果(6群：果実類, 5 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	71	85	78	MeIQ _x -d ₃ 64
MeIQ	66	104	85	
MeIQ _x	112	112	112	
Trp-P-1	121	162	142	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 39
Trp-P-2	133	100	117	
MeAαC	95	124	110	AαC- ¹⁵ N ₃ 46
AαC	94	99	97	
Glu-P-1	51	45	48	-
Glu-P-2	49	42	46	-
PhIP	85	102	94	PhIP-d ₃ 80

平均回収率：46% (Glu-P-2)～142% (Trp-P-1), - ; 内標使用せず

表-2-7 添加回収試験結果(7群：緑黄色野菜, 5 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率(%)	内標の平均回収率(%)
	1回目	2回目		
IQ	93	71	82	MeIQ _x -d ₃ 51
MeIQ	92	90	91	
MeIQ _x	89	91	90	
Trp-P-1	130	107	119	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 49
Trp-P-2	107	104	106	
MeA α C	95	77	86	A α C- ¹⁵ N ₃ 32
A α C	93	103	98	
Glu-P-1	35	30	33	-
Glu-P-2	28	22	25	-
PhIP	104	96	100	PhIP-d ₃ 62

平均回収率：25% (Glu-P-2)～119% (Trp-P-1), - ; 内標使用せず

表-2-8 添加回収試験結果(8群：その他の野菜類, 1 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率(%)	内標の平均回収率(%)
	1回目	2回目		
IQ	88	83	86	MeIQ _x -d ₃ 53
MeIQ	89	83	86	
MeIQ _x	107	99	103	
Trp-P-1	35	36	35	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 36
Trp-P-2	92	108	100	
MeA α C	32	48	40	A α C- ¹⁵ N ₃ 40
A α C	100	112	106	
Glu-P-1	37	60	49	-
Glu-P-2	38	47	43	-
PhIP	95	98	97	PhIP-d ₃ 32

平均回収率：35% (Trp-P-1)～106% (A α C), - ; 内標使用せず

表-2-9 添加回収試験結果(9群：嗜好飲料, 5 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率
	1回目	2回目		
IQ	72	81	77	MeIQ _x -d ₃ 67
MeIQ	90	90	90	
MeIQ _x	96	97	97	
Trp-P-1	105	124	115	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 45
Trp-P-2	88	100	94	
MeA α C	72	82	77	A α C- ¹⁵ N ₃ 50
A α C	95	94	95	
Glu-P-1	24	24	24	-
Glu-P-2	17	18	18	-
PhIP	95	95	95	PhIP-d ₃ 67

平均回収率：18% (Glu-P-2)～115% (Trp-P-1), - ; 内標使用せず

表-2-10 添加回収試験結果(10群：魚介類, 1 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	102	103	103	MeIQ _x -d ₃ 51
MeIQ	108	105	107	
MeIQ _x	118	97	108	
Trp-P-1	134	103	119	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 51
Trp-P-2	101	87	94	
MeA α C	190	139	165	A α C- ¹⁵ N ₃ 26
A α C	110	96	103	
Glu-P-1	30	59	45	-
Glu-P-2	28	59	44	-
PhIP	106	96	101	PhIP-d ₃ 48

平均回収率：44% (Glu-P-2)～165% (MeA α C), - ; 内標使用せず

表-2-11 添加回収試験結果(11群：肉類・卵類，5 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	80	83	82	MeIQ _x -d ₃ 86
MeIQ	78	80	79	
MeIQ _x	96	107	102	
Trp-P-1	105	85	95	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 66
Trp-P-2	95	91	93	
MeAαC	75	100	88	AαC- ¹⁵ N ₃ 88
AαC	91	92	92	
Glu-P-1	56	82	69	-
Glu-P-2	69	75	72	-
PhIP	83	98	91	PhIP-d ₃ 59

平均回収率：69% (Glu-P-1)～102% (MeIQ_x)， - ；内標使用せず

表-2-12 添加回収試験結果(12群：乳・乳製品，5 g)

HCA	回収率(%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	109	99	104	MeIQ _x -d ₃ 73
MeIQ	113	101	107	
MeIQ _x	95	93	94	
Trp-P-1	91	104	98	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 63
Trp-P-2	97	97	97	
MeAαC	72	95	84	AαC- ¹⁵ N ₃ 79
AαC	97	97	97	
Glu-P-1	56	26	41	-
Glu-P-2	62	26	44	-
PhIP	100	107	104	PhIP-d ₃ 61

平均回収率：41% (Glu-P-1)～107% (MeIQ)， - ；内標使用せず

表-2-13 添加回収試験結果(13群：調味料・香辛料類，1 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	66	29	48	MeIQ _x -d ₃ 72
MeIQ	76	44	60	
MeIQ _x	108	98	103	
Trp-P-1	119	101	110	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 56
Trp-P-2	104	92	98	
MeAαC	121	91	106	AαC- ¹⁵ N ₃ 58
AαC	99	107	103	
Glu-P-1	56	34	45	-
Glu-P-2	57	35	46	-
PhIP	98	96	97	PhIP-d ₃ 72

平均回収率：45% (Glu-P-1)～110% (Trp-P-1)， - ；内標使用せず

表-2-14 添加回収試験結果(14群：飲料水，5 g)

HCA	回収率 (%)		平均回収率 (%)	内標の平均回収率 (%)
	1回目	2回目		
IQ	87	84	86	MeIQ _x -d ₃ 89
MeIQ	91	85	88	
MeIQ _x	97	92	95	
Trp-P-1	100	96	98	Trp-P-2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N 77
Trp-P-2	103	96	100	
MeAαC	103	97	100	AαC- ¹⁵ N ₃ 76
AαC	102	103	103	
Glu-P-1	75	78	77	-
Glu-P-2	74	75	75	-
PhIP	83	91	87	PhIP-d ₃ 78

平均回収率：75% (Glu-P-2)～103% (AαC)， - ；内標使用せず

AOAC が添加濃度 10 ng/g において推奨している添加回収率(真度)の範囲は 70~125% であることから、表-2-15 に範囲外となる物質と食品群をまとめた。

参照文献：AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals

表-2-15 TDS 試料を用いた真度の確認で平均回収率が 70~125%を外れたもの

HCA	TDS 食品群
IQ	13 群 (48%)
MeIQx	13 群 (60%)
MeIQx	なし
Trp-P-1	6 群 (142%)、8 群 (35%)
Trp-P-2	なし
MeA α C	4 群 (141%)、8 群 (40%)、10 群 (165%)
A α C	なし
Glu-P-1	4 群、14 群以外の全ての群
Glu-P-2	11 群、14 群以外の全ての群
PhIP	なし

表-2-15 のように、一部の食品群で推奨範囲を外れる項目があった。この原因として、油脂類(4 群)や調味料・香辛料類(13 群)では共存する成分の影響による LC/MS/MS 測定の際の阻害などが考えられたが、詳細は不明であった。

② 検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) の推定及び確認

定量限界 (LOQ) を 1 ng/g 付近と仮定して、定量限界値付近の測定値のバラツキから検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) を推定した。すなわち、4 群(油脂類)、11 群(肉類)に、1 ng/g 相当を添加し試行数 2 回で 5 日間添加回収試験を実施し、測定値から次式により検出限界と定量限界を求めた。(表-3-1 及び 3-2)

$$LOD=2 \times t(n-1, 0.05) \times s, LOQ=10s$$

s : 標準偏差、自由度 (n-1) : 9、 $t(n-1, 0.05)=1.833$

表-3-1 検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) の確認 (4 群)

試行	測定値 (ng/g)									
	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1	1.072	1.111	1.032	0.900	0.758	1.704	0.892	0.478	0.583	1.109
2	1.092	1.284	0.771	0.854	0.572	1.501	0.937	0.439	0.472	0.955
3	0.677	0.561	1.041	0.964	0.491	1.523	1.079	0.336	0.314	0.682
4	0.554	0.562	0.877	0.932	0.567	1.420	1.014	0.462	0.423	0.784
5	1.055	1.250	0.902	0.868	0.668	1.762	1.061	0.423	0.554	0.883
6	0.763	0.882	0.975	1.029	0.950	1.584	1.272	0.375	0.487	0.795
7	0.512	0.979	1.171	0.971	0.697	1.678	1.242	0.463	0.537	0.951
8	0.652	0.897	1.009	0.977	0.698	1.299	1.161	0.591	0.614	0.788
9	0.729	1.003	1.023	0.953	0.714	1.183	1.035	0.463	0.534	0.787
10	1.011	0.988	0.977	0.816	0.763	1.040	0.802	0.346	0.353	0.705
平均	0.811	0.951	0.977	0.926	0.687	1.469	1.049	0.437	0.487	0.843
標準偏差(s)	0.224	0.245	0.108	0.065	0.127	0.235	0.149	0.074	0.098	0.130
LOD	0.9	0.9	0.4	0.3	0.5	0.9	0.6	0.3	0.4	0.5
LOQ	2.3	2.5	1.1	0.7	1.3	2.4	1.5	0.8	1.0	1.3

注) MeA α C は、定量イオンに 0.8 ng/g 相当の妨害ピークが認められたため高い値になっている。

4 群を用いた油脂試料の検出限界は、0.3~0.9 ng/g、定量限界が 0.7~2.5 ng/g と確認された。機器の感度(S/N)から判断しても、この濃度での確認が可能であったため、MeA α C を除きこの結果は妥当と判断された。MeA α C については妨害が 0.8 ng/g 相当認められたため、この値を加算し LOD ; 1.7 ng/g、LOQ ; 3.2 ng/g と推定した。

表-3-2 検出限界(LOD)及び定量限界(LOQ)の確認(11群)

試行	測定値 (ng/g)									
	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1	0.644	0.556	1.048	0.698	0.761	0.420	0.907	0.647	0.482	0.912
2	0.624	0.618	1.073	0.711	0.464	0.653	0.846	0.521	0.528	0.686
3	0.721	0.843	0.948	0.818	0.986	0.746	1.086	0.652	0.558	0.921
4	0.809	0.813	0.952	0.904	0.634	1.054	1.163	0.549	0.678	0.780
5	0.657	0.752	0.922	0.724	0.861	0.408	0.958	0.559	0.445	0.795
6	0.734	0.765	0.865	0.801	0.741	0.622	0.943	0.474	0.562	0.587
7	0.333	0.375	1.042	0.701	0.881	0.654	0.869	0.314	0.599	0.707
8	0.808	0.702	0.962	0.842	0.762	0.610	1.041	0.481	0.624	1.405
9	0.635	0.792	1.296	1.055	1.108	0.663	0.900	0.780	1.183	0.691
10	0.655	0.525	1.129	0.870	0.943	0.704	0.917	0.907	0.839	0.688
平均	0.662	0.674	1.02	0.812	0.814	0.653	0.963	0.588	0.649	0.817
標準偏差(s)	0.134	0.151	0.124	0.113	0.184	0.179	0.101	0.167	0.217	0.231
LOD	0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.9
LOQ	1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	1.7	2.2	2.4

油脂試料以外の試料のために 11 群を用いて推定した検出限界は、0.4~0.9 ng/g、定量限界が 1.1~2.4 ng/g と確認された。4 群の場合と同様に、機器の感度から十分に確認可能な濃度であり、この結果は妥当と判断された。これらの結果から推定された検出限界(LOD)及び定量限界(LOQ)を表-3-5 にまとめた。

表-3-3 繰り返し試験で求めた検出限界(LOD)及び定量限界(LOQ)

HCA	油脂試料(4群)		油脂以外の試料(11群)	
	検出限界(LOD)	定量限界(LOQ)	検出限界(LOD)	定量限界(LOQ)
IQ	0.9	2.3	0.5	1.4
MeIQ	0.9	2.5	0.6	1.6
MeIQx	0.4	1.1	0.5	1.3
Trp-P-1	0.3	0.7	0.5	1.2
Trp-P-2	0.5	1.3	0.7	1.9
MeA α C	0.9*	2.4*	0.7	1.8
A α C	0.6	1.5	0.4	1.1
Glu-P-1	0.3	0.8	0.7	1.7
Glu-P-2	0.4	1.0	0.8	2.2
PhIP	0.5	1.4	0.9	2.4

* MeA α Cについては、妨害がLODと同じレベルで存在していた。

次に、他の TDS 食品群において、上記の定量限界付近の 1 ng/g 濃度で添加回収試験を行い、HCA 類が確認できるかどうかを調査した。

MeIQ が 10 群(魚介類)で回収率 33%、8 群(その他の野菜類)において、Trp-P-1 が 1 ng/g では定量値が得られず(10 ng/g 添加の回収率は 35%)、MeA α C が 30%(10 ng/g 添加では 40%)であった。Glu-P-1 及び Glu-P-2 は、7 群、8 群、9 群、10 群及び 13 群において 1 ng/g 添加の回収率が 40%以下であった。なかでも Glu-P-1 は、8 群と 13 群では定量値が得られなかった。

以上の結果から、以下の点を考慮して表-3-3 で求めた検出限界(LOD)及び定量限界(LOQ)の推定値を修正した。

- i) 4 群では、MeA α C の試料由来バックグラウンド値を加算した。
- ii) 10 群の MeIQ は、回収率を考慮し 3 倍の値とした。
- iii) 8 群の Trp-P-1 は、10 ng/g の繰り返し試験の測定値の標準偏差を用いて同様に LOD および LOQ を求めた(LOD ; 3.2、LOQ;8.7)。
- iv) 8 群の MeA α C は、回収率を考慮し 3 倍の値とした。
- v) Glu-P-1 及び Glu-P-2 については、10 ng/g の添加回収試験より求めた LOD 及び LOQ を採用した(4 群と 11 群以外の群)。

最終的に推定した検出限界(LOD)及び定量限界(LOQ)を表-3-4 に示した。

表3-4 最終的に推定した検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

HCA	4 群		8 群		10 群		11 群		左記以外の群	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
IQ	0.9	2.3	0.5	1.4	0.5	1.4	0.5	1.4	0.5	1.4
MeIQ	0.9	2.5	0.6	1.6	1.8	4.8	0.6	1.6	0.6	1.6
MeIQx	0.4	1.1	0.5	1.3	0.5	1.3	0.5	1.3	0.5	1.3
Trp-P-1	0.3	0.7	3.2	8.7	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2
Trp-P-2	0.5	1.3	0.7	1.9	0.7	1.9	0.7	1.9	0.7	1.9
MeA α C	1.7	3.2	2.1	5.4	0.7	1.8	0.7	1.8	0.7	1.8
A α C	0.6	1.5	0.4	1.1	0.4	1.1	0.4	1.1	0.4	1.1
Glu-P-1	0.3	0.8	4.9	14	4.9	14	0.7	1.7	4.9	14
Glu-P-2	0.4	1.0	3.8	11	3.8	11	0.8	2.2	3.8	11
PhIP	0.5	1.4	0.9	2.4	0.9	2.4	0.9	2.4	0.9	2.4

太字で示したものは、表-3-3 の結果を変更した値。

③ 精度の確認

4群と11群に10 ng/g相当添加した試料を併行2回で5日間試験し、一元配置の分散分析により併行精度及び室内精度を求めた(表-4-1及び4-2)。

表-4-1 精度の確認(4群)

試行	測定値 (ng/g)									
	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1日目 1回目	9.970	11.291	9.903	10.020	7.305	8.162	8.984	5.038	4.249	8.538
2回目	9.349	10.151	10.371	10.502	6.969	9.542	8.827	4.789	4.317	9.347
2日目 1回目	8.747	8.200	9.380	8.645	6.719	11.625	10.393	4.211	4.330	7.425
2回目	7.747	7.589	9.352	8.325	6.518	11.334	9.830	4.457	4.127	8.933
3日目 1回目	8.096	8.722	9.508	8.369	7.003	8.628	9.195	6.058	6.893	8.302
2回目	8.064	8.722	9.625	8.191	6.693	7.956	8.794	5.795	6.346	7.415
4日目 1回目	8.517	9.317	9.690	9.043	7.495	10.192	8.897	4.680	4.853	9.134
2回目	9.517	10.523	10.506	9.806	8.465	11.272	11.121	4.119	4.322	9.156
5日目 1回目	9.269	9.587	10.075	9.002	7.341	9.548	9.474	5.398	5.466	7.451
2回目	8.949	9.988	10.680	9.853	7.859	11.849	10.976	5.605	5.728	8.817
平均	8.82	9.40	9.90	9.17	7.23	10.0	9.64	5.01	5.06	8.45
標準偏差(s)	0.718	1.12	0.479	0.816	0.594	1.46	0.892	0.676	0.990	0.766
併行精度(RSD _r)%	5.7	6.1	3.6	4.5	5.3	9.4	9.1	4.7	5.2	8.8
室内精度(RSD _R)%	8.4	12.5	5.0	9.3	8.5	15.2	9.3	14.2	20.7	9.1

4群における併行精度(RSD_r)は、3.6~9.4%、室内精度(RSD_R)は5.0~20.7%とほぼ良好な結果が得られた。

表-4-2 精度の確認(11群)

試行	測定値 (ng/g)									
	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1日目 1回目	7.164	8.349	9.572	8.108	8.492	8.938	9.118	6.008	6.798	11.525
2回目	8.604	8.039	10.268	7.375	5.712	7.741	8.429	4.732	4.510	6.885
2日目 1回目	7.020	7.511	9.092	7.711	6.852	7.383	9.959	5.333	5.195	5.832
2回目	6.689	6.296	10.002	8.759	7.763	7.315	10.102	4.846	4.877	7.357
3日目 1回目	5.804	5.780	10.054	8.588	6.963	7.359	10.034	5.719	5.441	7.750
2回目	8.074	7.107	10.591	6.527	7.113	6.345	8.729	8.906	7.614	9.331
4日目 1回目	8.314	7.971	10.656	6.605	6.906	7.607	9.019	6.339	6.113	8.457
2回目	7.971	7.835	9.579	8.168	7.195	5.733	8.880	4.300	5.696	7.172
5日目 1回目	7.371	7.881	9.194	8.876	6.649	7.316	8.967	5.944	4.599	5.839
2回目	9.307	8.269	10.398	8.714	7.313	6.441	9.048	4.596	4.615	8.062
平均	7.63	7.50	9.94	7.94	7.09	7.21	9.22	5.67	5.54	7.82
標準偏差(s)	1.02	0.859	0.558	0.868	0.721	0.883	0.588	1.32	1.03	1.69
併行精度(RSD _r)%	13.9	7.9	6.5	11.5	13.4	11.4	5.1	23.7	18.2	23.2
室内精度(RSD _R)%	13.9	11.8	6.5	11.5	13.4	12.3	6.5	23.7	18.7	23.2

11群における併行精度(RSD_r)は、5.1~23.7%、室内精度(RSD_R)は6.5~23.7%とほぼ良好な結果が得られた。

④ 特異性

MeA α C の定量イオンにおいて TDS4 群試料に 0.8 ng/g 相当の妨害ピークが、また一部の焼き魚試料で Glu-P-1 の定量イオンにおいてピークが認められたが、いずれも確認イオンではピークは認められなかった。そこで、確認イオンの結果から MeA α C および Glu-P-1 が検出していないと判断できた。その他の定量イオンにピークが認められなかった試料においては、妨害がなく測定可能と判断された。

したがって、LC/MS/MS の測定において 2 種類のプロダクトイオンをモニターすることによって全ての HCA 類について定性及び定量が可能であると判断された。

6.2 トータルダイエット (TDS) 試料の調製及び分析

別添-1に示す要領で1～14群の試料(表-5)を調製した。その分析結果を表-6-1～6-5に示した。

表-5 TDS試料の分類

食品群	分類
1群	米及び加工品
2群	米以外の穀類、種実類及びいも類
3群	砂糖・菓子類
4群	油脂類
5群	豆類及び加工品
6群	果実類
7群	緑黄色野菜類
8群	その他の野菜類、きのこ類及び海藻類
9群	嗜好飲料
10群	魚介類
11群	肉類、卵類
12群	乳及び乳製品
13群	調味料・香辛料類
14群	飲料水

表-6-1 TDS試料の分析結果(4、8、10、11群以外)

群	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界	0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	4.9	3.8	0.9
定量限界	1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	14	11	2.4

ND ; 検出限界未満

表-6-2 TDS試料の分析結果(4群)

群	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界	0.9	0.9	0.4	0.3	0.5	1.7	0.6	0.3	0.4	0.5
定量限界	2.3	2.5	1.1	0.7	1.3	3.2	1.5	0.8	1.0	1.3

ND ; 検出限界未満

表-6-3 TDS試料の分析結果(8群)

群	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界	0.5	0.6	0.5	3.2	0.7	2.1	0.4	4.9	3.8	0.9
定量限界	1.4	1.6	1.3	8.7	1.9	5.4	1.1	14	11	2.4

ND ; 検出限界未満

表-6-4 TDS試料の分析結果(10群)

群	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界	0.5	1.8	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	4.9	3.8	0.9
定量限界	1.4	4.8	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	14	11	2.4

ND ; 検出限界未満

表-6-5 TDS試料の分析結果(11群)

群	IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界	0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.9
定量限界	1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	1.7	2.2	2.4

ND ; 検出限界未満

検出限界と定量限界が、食品群と特定のHCA類により異なるため、TDS試料の分析結果を分けて記載したが、14群いずれのTDS試料においてもHCA類は全て検出限界未満であった。

6.3 市販食品の調査結果

市販食品を購入し分析した結果を表-7-1及び7-2に示した。

表-7-1 市販食品の分析結果(1)

番号	品名	HCA分析結果 (ng/g)									
		IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
1	ハンバーグ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ギョーザ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	トンカツ(衣)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	トンカツ(肉)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	焼き鳥1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.6	ND	ND	ND
6	焼き鳥2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	唐揚げ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ローストビーフ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	焼ブタ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	焼き魚1(ほっけ)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	焼き魚2(さけ)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	焼き魚3(さば)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	焼き魚4(さんま)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ウナギ蒲焼	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	カツオのたたき	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	イカの天ぷら	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	エビフライ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界		0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.9
定量限界		1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	1.7	2.2	2.4

ND ; 検出限界未満

表-7-2 市販食品の分析結果(2)

番号	品名	HCA分析結果 (ng/g)									
		IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
18	削りぶし1	ND	ND	tr(0.9)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	削りぶし2	ND	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	サラミ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	スモークサーモン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	燻製ハム	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	ビーフジャーキー	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	ピザ(宅配)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	コロッケ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	春巻き	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	卵焼き	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ほうじ茶(PET)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	缶コーヒー	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	ビール(ラガー)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	ワイン(赤)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界		0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.9
定量限界		1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	1.7	2.2	2.4

ND ; 検出限界未満、tr ; 検出限界以上で定量限界未満("trace"を略して"tr."と表記した。)

6.4 調理の影響調査

豚肉及びブリの切り身を用いて、調理方法の違いと HCA 類生成の関係を調査した。

表-8 に調理方法を、分析結果を表-9 に示した。また、調理した検体の写真を別添-2 に示した。

表-8 調理方法

調理器具・方法		魚(ブリ切り身)	肉(豚肉ステーキ用)
ホットプレート(設定温度 160℃)	油なし	普通 約5分	普通 約5分
		強め 約10分	強め 約10分
	油あり	普通 約5分	普通 約5分
		強め 約10分	強め 約10分
フィッシュロースター		普通 9分	-
		強め 15分	-
直火(弱火) : ガス コンロの網上	香辛料(塩・胡椒)なし	普通 片面2分×2	同左
		強め 片面5分×2	同左
	香辛料あり	強め 片面5分×2	同左
揚げ物(サラダ油)	から揚げ粉なし	普通 片面1分×2	同左
		強め 片面2分×2	同左
	から揚げ粉あり	強め 片面2分×2	同左

表-9 調理試験の分析結果

調理 方法				HCA分析結果 (ng/g)									
				IQ	MeIQ	MeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C	A α C	Glu-P-1	Glu-P-2	PhIP
ホットプレート	豚肉	油なし	普通	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	豚肉	油なし	強め	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	豚肉	油あり	普通	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	豚肉	油あり	強め	ND	ND	1.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.0
	ブリ	油なし	普通	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	油なし	強め	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	油あり	普通	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	油あり	強め	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
フィッシュロースター	ブリ	普通		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	強め		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
直火	豚肉	普通		ND	ND	tr(0.5)	ND	ND	tr(1.0)	9.3	ND	ND	13
	豚肉	強め		ND	ND	1.9	tr(0.7)	ND	8.0	68	ND	ND	120
	豚肉	強め	香辛料	ND	ND	1.4	ND	ND	2.4	20	ND	ND	27
	ブリ	普通		ND	ND	Tr(0.5)	ND	ND	tr(0.8)	8.2	ND	ND	ND
	ブリ	強め		ND	ND	ND	ND	ND	tr(1.2)	8.9	ND	ND	tr(0.8)
	ブリ	強め	香辛料	2.0	ND	Tr(0.8)	tr(0.7)	ND	4.4	33	ND	ND	3.7
揚げ物	豚肉	普通		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	豚肉	強め		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	豚肉	強め	香辛料	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	普通		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	強め		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ブリ	強め	香辛料	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界				0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.9
定量限界				1.4	1.6	1.3	1.2	1.9	1.8	1.1	1.7	2.2	2.4

ND ; 検出限界未満、tr ; 検出限界以上で定量限界未満("trace"を略して"tr."と表記した。)

7 まとめ

本調査では、毒性が懸念されている 10 種の HCA 類の国内流通食品の含有実態調査を実施した。調査の実施に当たっては、これまでの報告を参考に抽出法及び精製法を検討し、幅広い食品に対して適用可能なタンデム型の質量分析計を用いた分析法を確立した。本分析法では基本的に内標準物質としてサロゲート物質(安定同位体標識化合物)を用いた。内標準物質が入手できた HCA 類については良好な回収率及び精度が得られたが、Glu-P-1 及び Glu-P-2 については内標準物質が入手できなかったため、食品マトリックスの影響により平均回収率が 50%以下の場合が多く認められた。また、PhIP については、採用した精製操作において他の HCA 類と挙動が異なるため、同時分析が困難であった。

確立した分析法を用いて TDS 試料を分析したところ、14 群すべてにおいて HCA 類は検出されなかった。存在が予想されている食品のみを測定対象としている既存の報告においてさえその存在量が極めて低濃度であること、及び TDS 試料が混合試料であることを考慮すれば極めて妥当な結果であると言える。

同様に加熱調理された市販食品(調理済惣菜)または HCA 類が存在する可能性のある食品を分析したところ、焼き鳥から A α C 及び削りぶしから MeIQx が微量検出された以外、他の全ての検体中に HCA 類の存在は認められなかった。この結果から、市販の調理食品中に HCA 類が高濃度で含有されていないことの確認はされた。しかしながら、これまでの報告から食品中には 1 ng/g 以下の低濃度で HCA 類は存在しているといわれ、正確な存在量を測定するためには、さらに測定感度の高い分析法が必要となる。

さらに、家庭内で調理された食品に HCA 類が検出されるかを確認するために、調理法と HCA 類生成量との関係について調査した。豚肉とブリの切り身を調理し、生成する HCA 類の量を測定した。この結果、直火でかなり焦げめが入るほど強めに焼いたときにのみ一部の HCA 類が比較的高濃度で検出された。しかしながら、他の調理方法や一般家庭での調理と同程度と考えられる焼き具合では、ほとんど検出されなかった。また、油を用いた場合の影響はあまり認められなかった。香辛料を用いた際には、MeA α C と A α C に生成量の変化が認められ、香辛料を用いない場合と比較して豚肉では生成量が少なく、ブリでは生成量が多くなる結果が得られた(ただし、水分含量の変化は考慮していない)。

以上の結果から、通常の家内での調理品や市販食品では HCA 類は 1 ng/g レベルの濃度では HCA 類は存在しないが、過度の調理条件(焼き加減)によっては高濃度の HCA が生成する可能性が高いというこれまでの報告を裏付ける結果が得られた。

8 参考資料

8.1 検量線及びクロマトグラム例

1) 検量線の一例

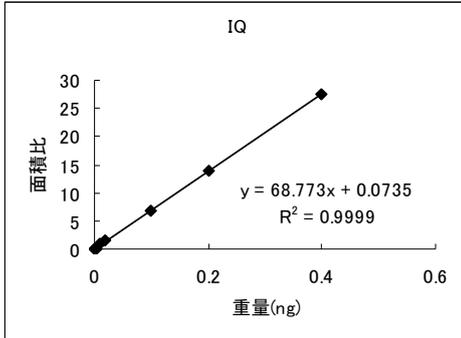


図-1 IQ の検量線の一例

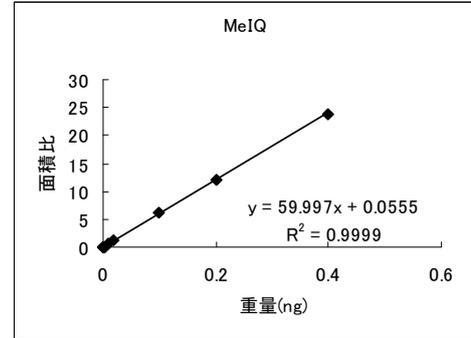


図-2 MeIQ の検量線の一例

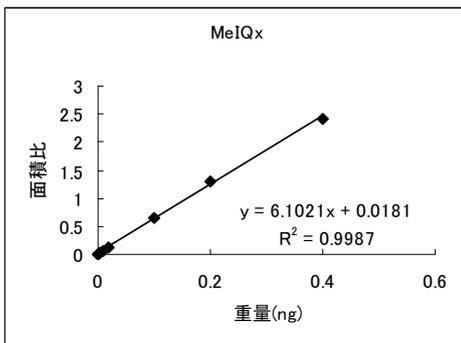


図-3 MeIQx の検量線の一例

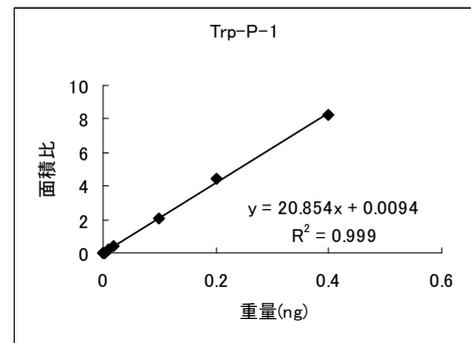


図-4 Trp-P-1 の検量線の一例

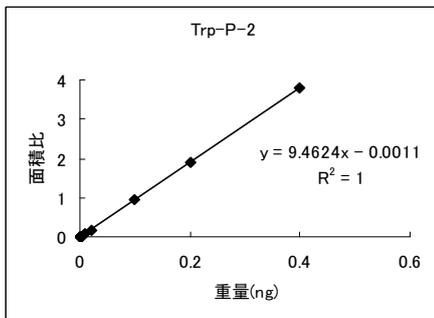


図-5 Trp-P-2 の検量線の一例

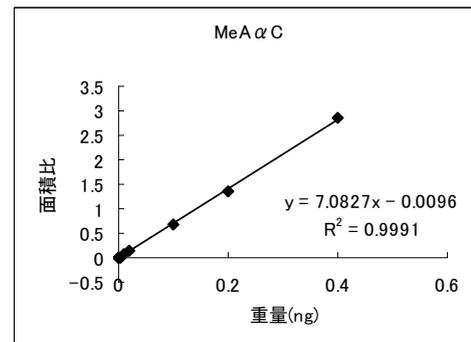


図-6 MeAαC の検量線の一例

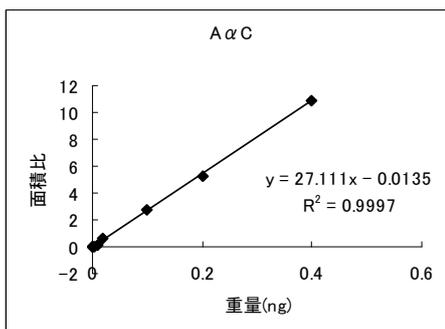


図-7 AαC の検量線の一例

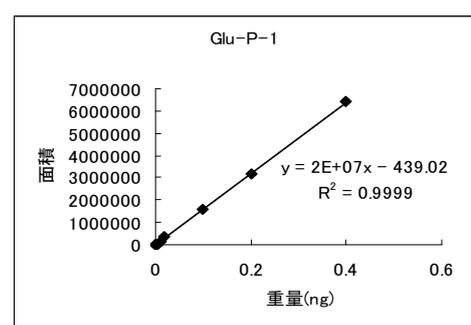


図-8 Glu-P-1 の検量線の一例

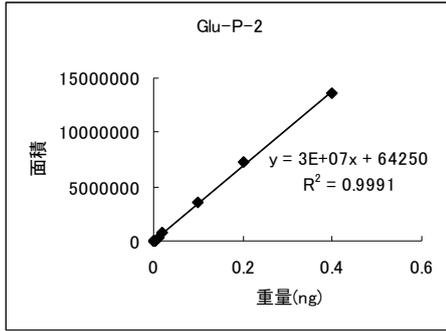


図-9 Glu-P-2 の検量線の一例

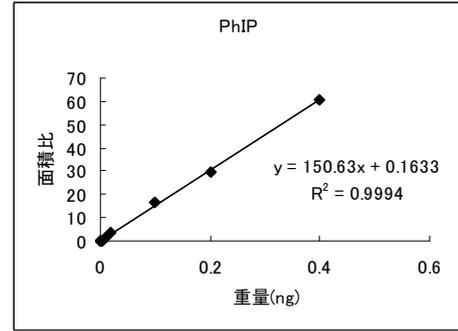


図-10 PhIP の検量線の一例

2) 標準溶液のクロマトグラムの一例

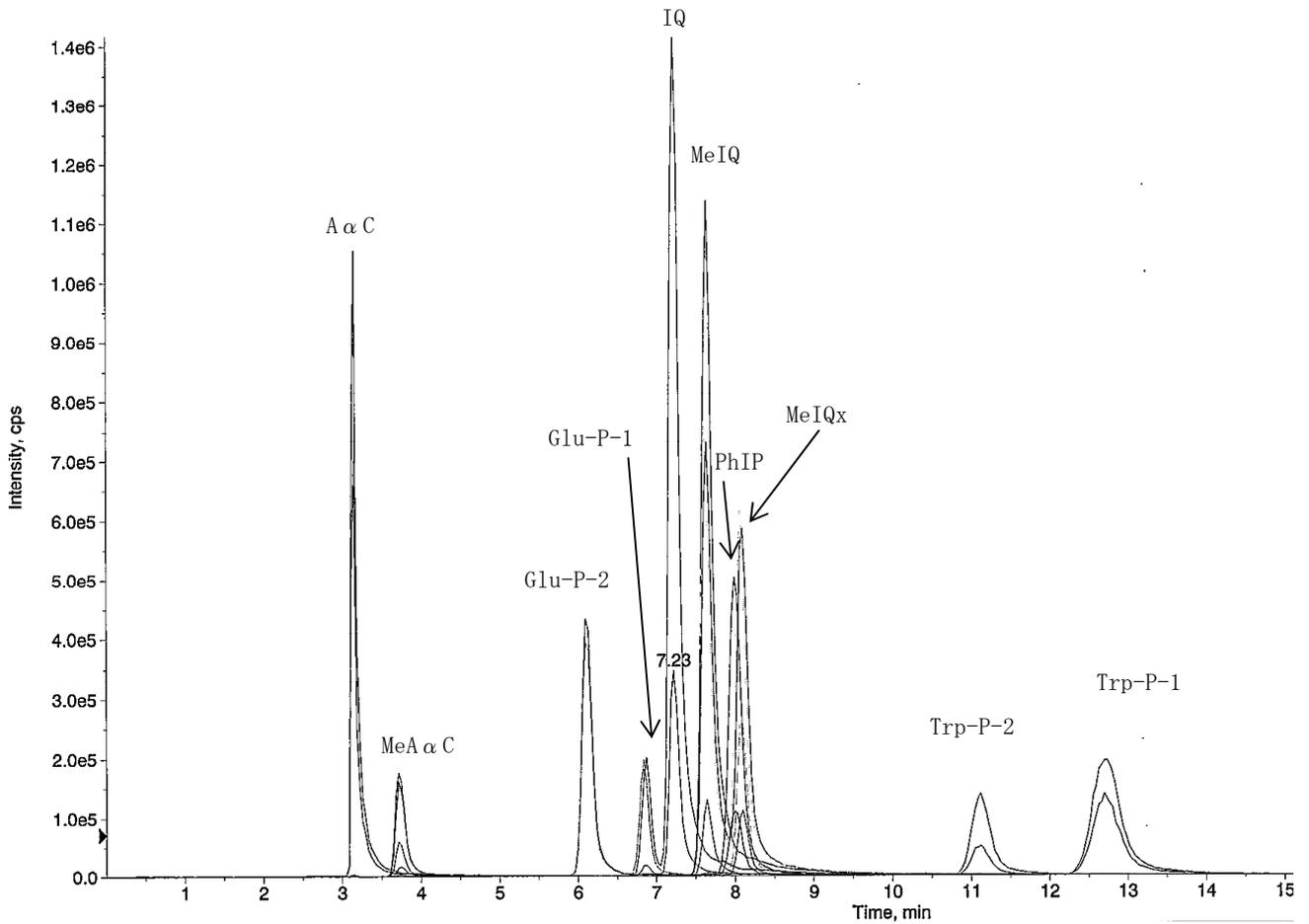
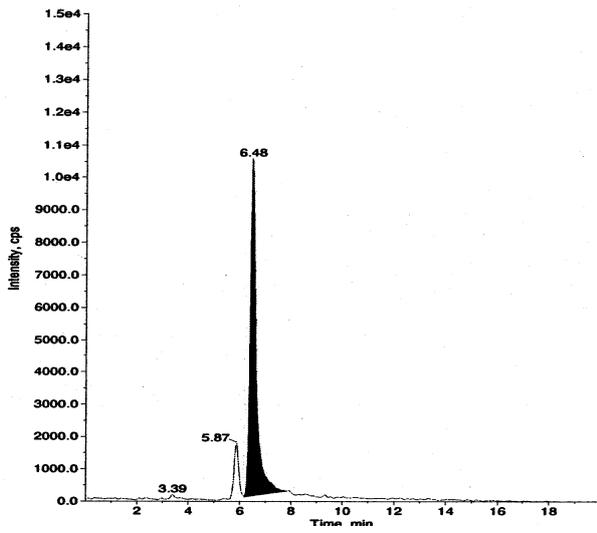
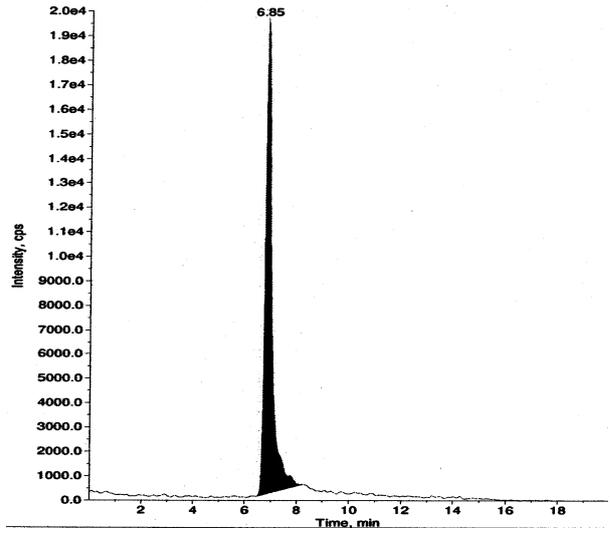


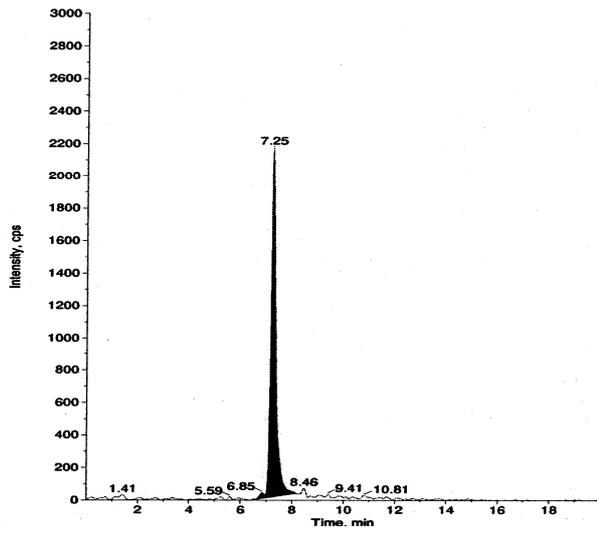
図-11 HCA のクロマトグラム



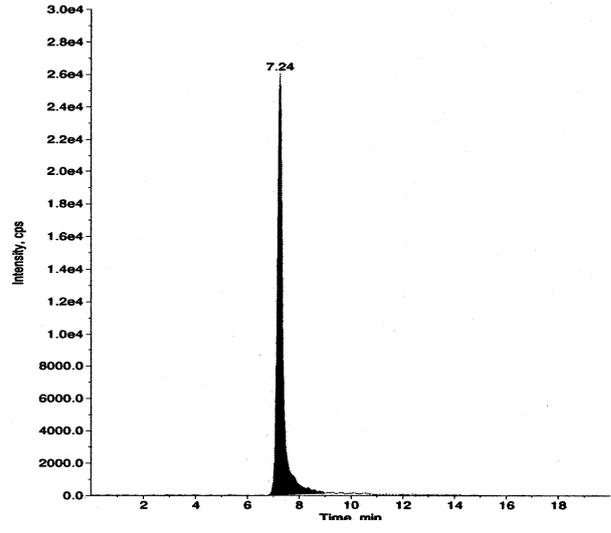
☒-12 IQ (0.01 mg/L)



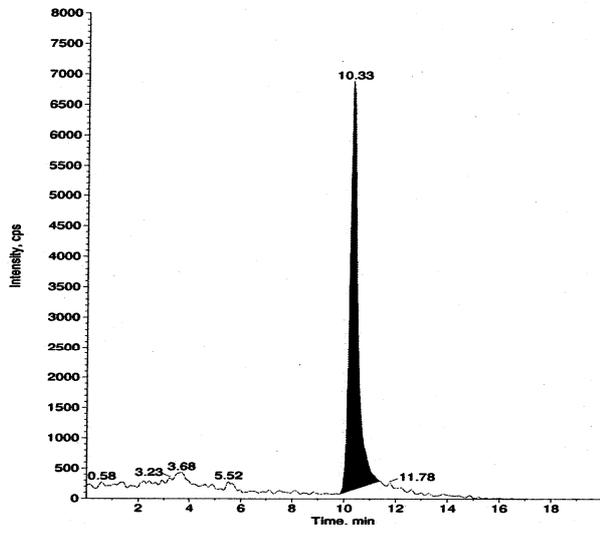
☒-13 MeIQ (0.01 mg/L)



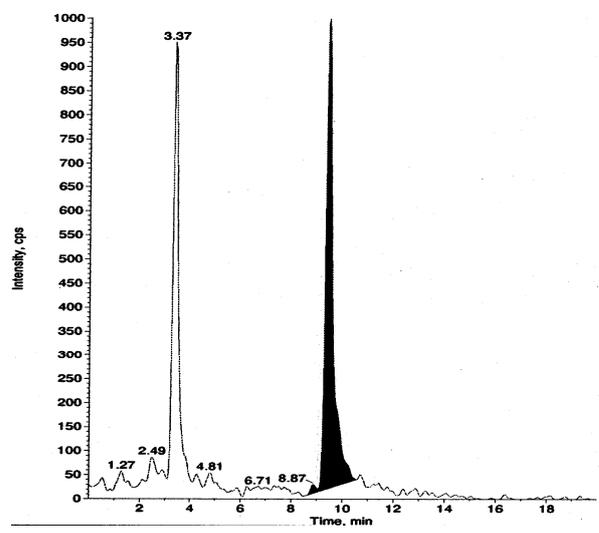
☒-14 MeIQx (0.01 mg/L)



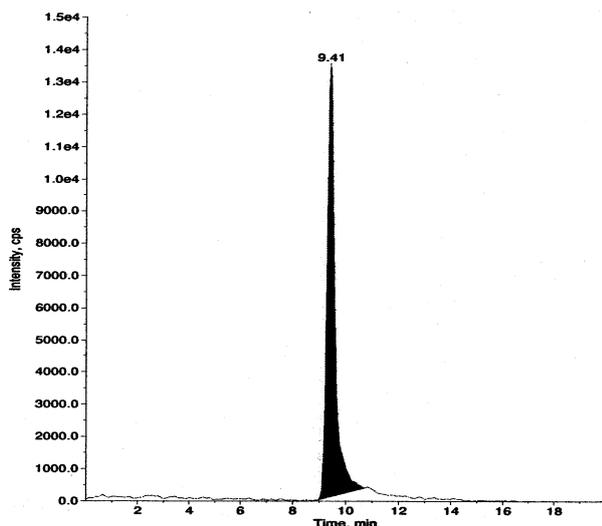
☒-15 MeIQx-d₃ (0.02 mg/L)



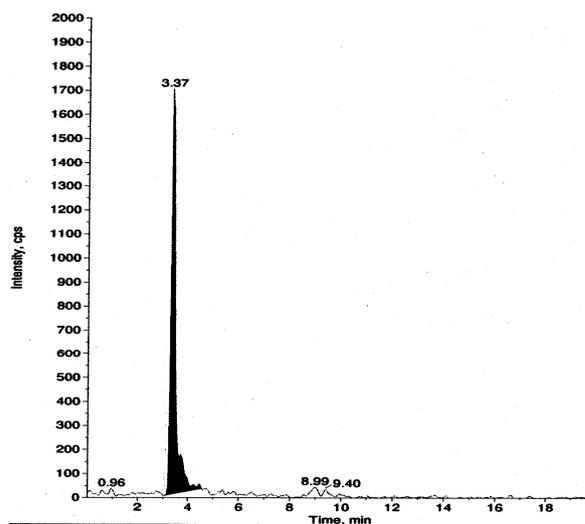
☒-16 Trp-P-1 (0.01 mg/L)



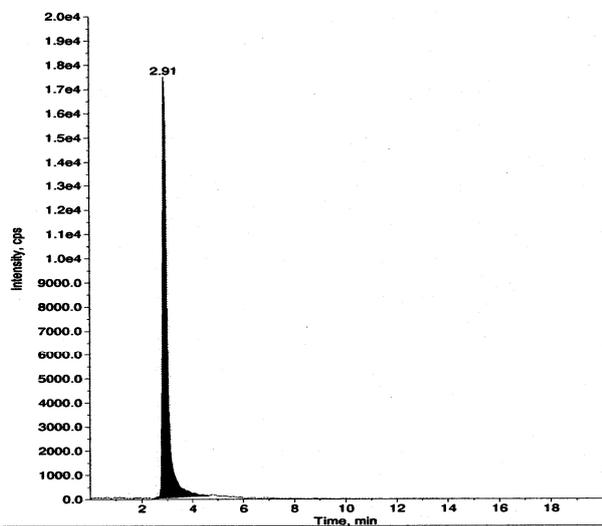
☒-17 Trp-P-2 (0.01 mg/L)



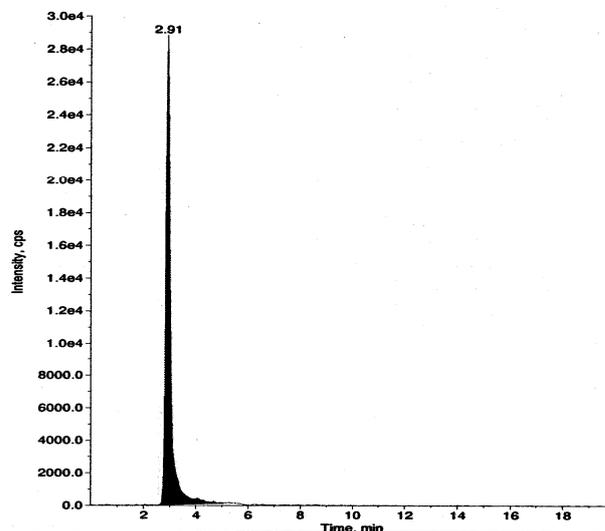
☒-18 Trp-P-2-¹³C₂, ¹⁵N (0.02 mg/L)



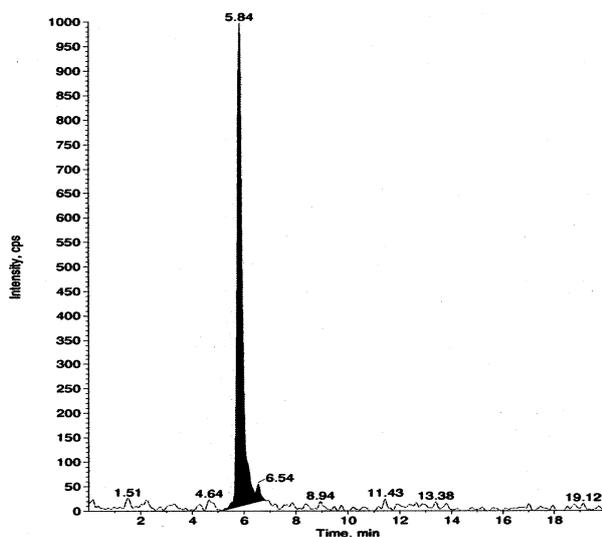
☒-19 MeAαC (0.01 mg/L)



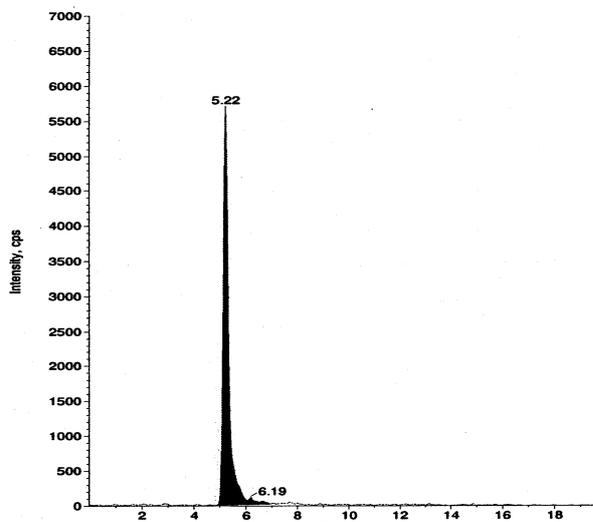
☒-20 AαC (0.01 mg/L)



☒-21 AαC-¹⁵N (0.02 mg/L)



☒-22 Glu-P-1 (0.01 mg/L)



☒-23 Glu-P-2 (0.01 mg/L)

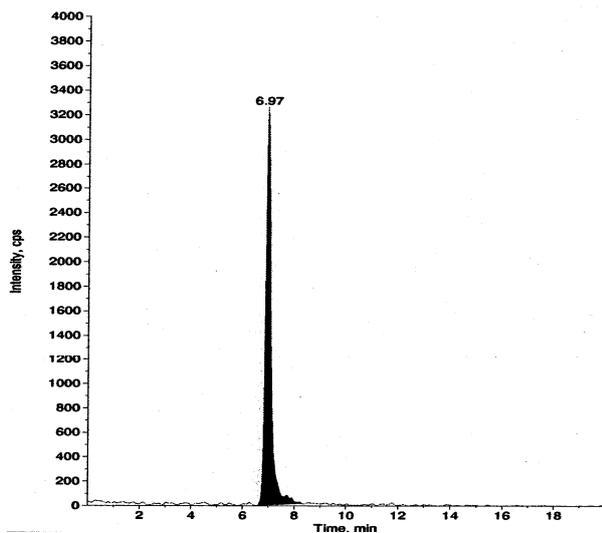


図-24 PhIP (0.01 mg/L)

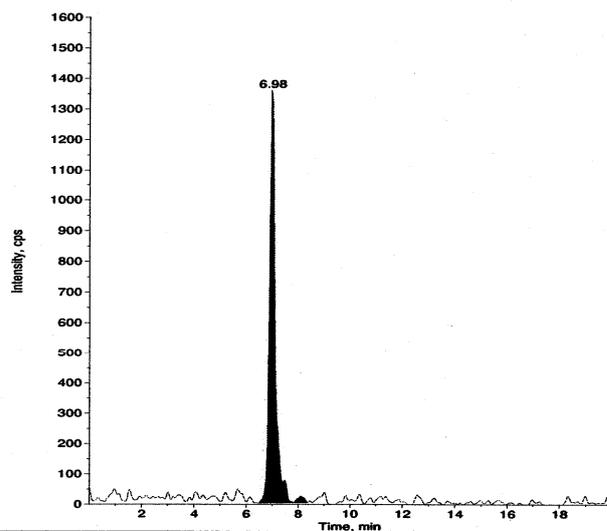


図-25 PhIP-d₃ (0.02 mg/L)

3) 検体のクロマトグラムの一例

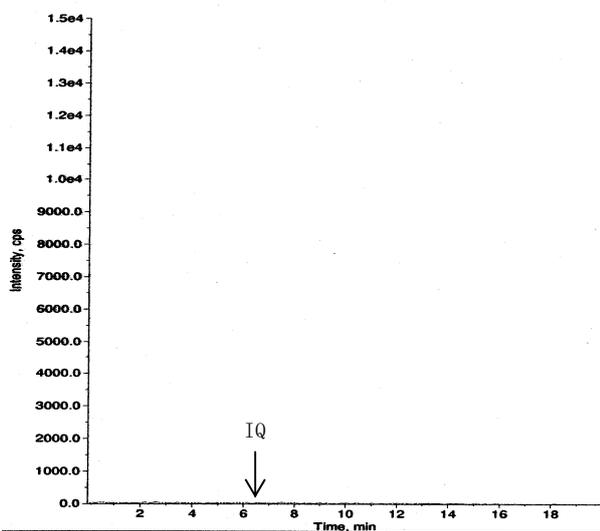


図-26 TDS11 群(IQ)無添加

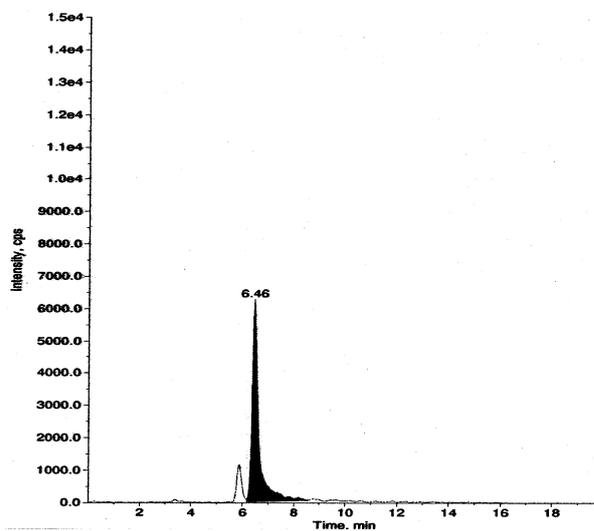


図-27 TDS11 群(IQ)添加(10 ng/g)

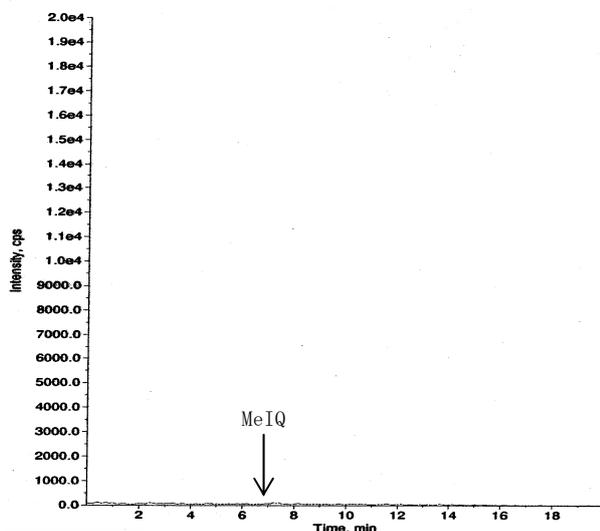


図-28 TDS11 群(MeIQ)無添加

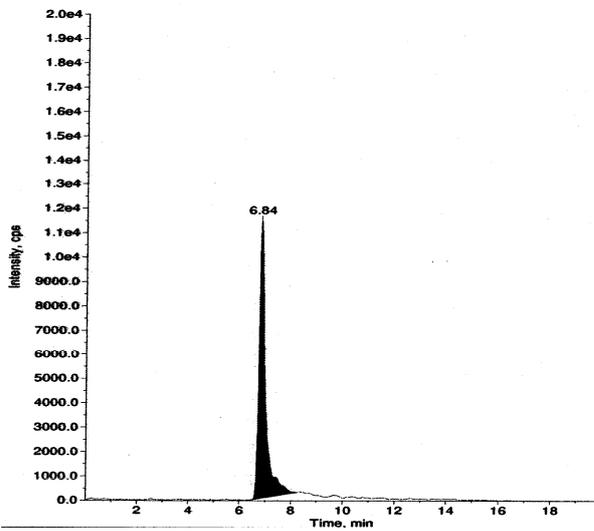


図-29 TDS11 群(MeIQ)添加(10 ng/g)

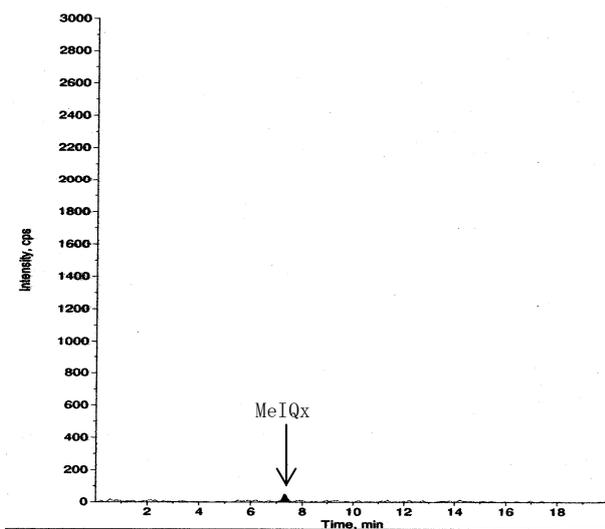


図-30 TDS11群(MeIQx)無添加

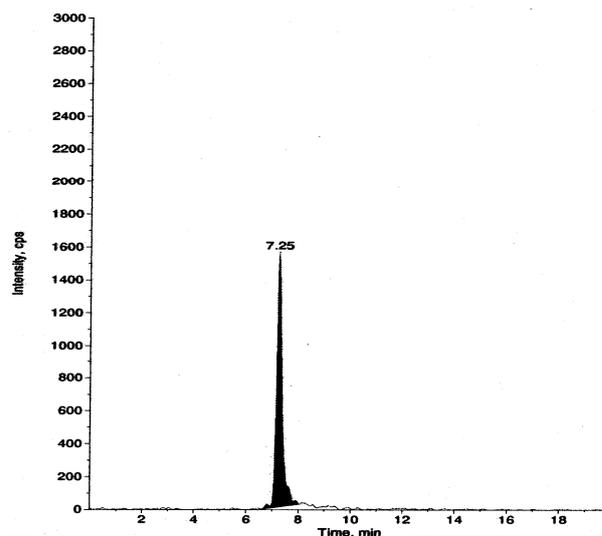


図-31 TDS11群(MeIQx)添加(10 ng/g)

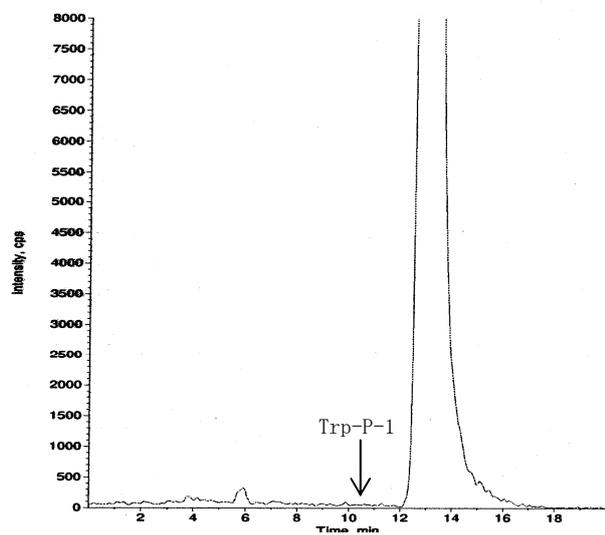


図-32 TDS11群(Trp-P-1)無添加

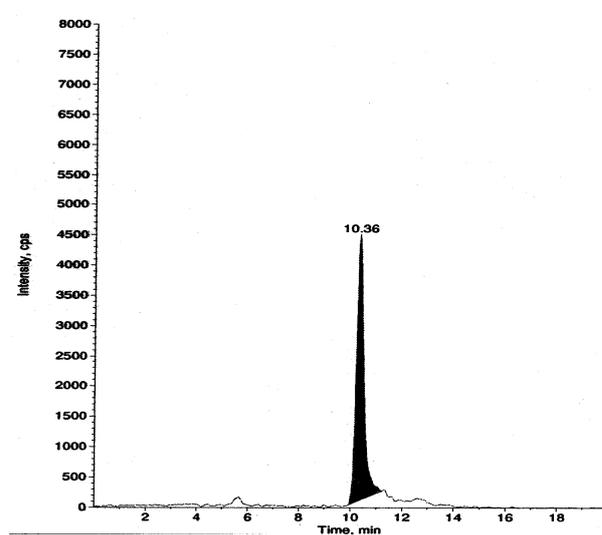


図-33 TDS11群(Trp-P-1)添加(10 ng/g)

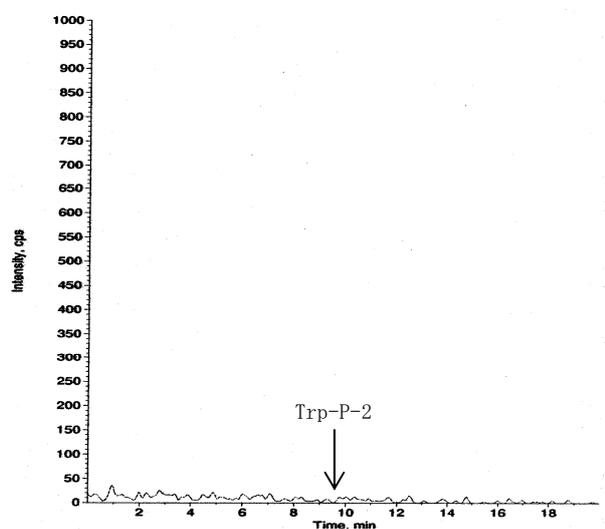


図-34 TDS11群(Trp-P-2)無添加

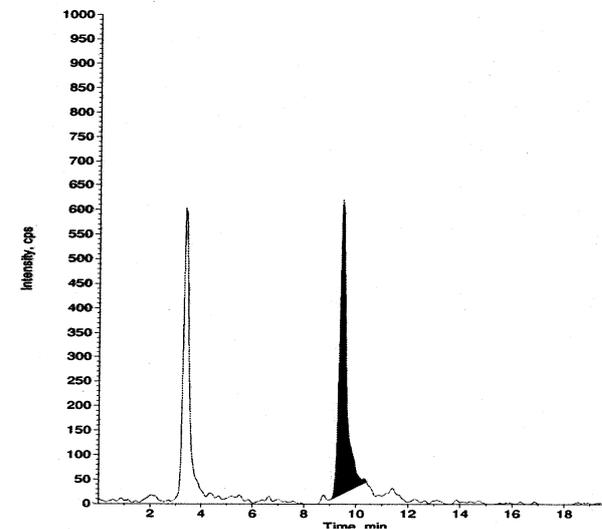


図-35 TDS11群(Trp-P-2)添加(10 ng/g)

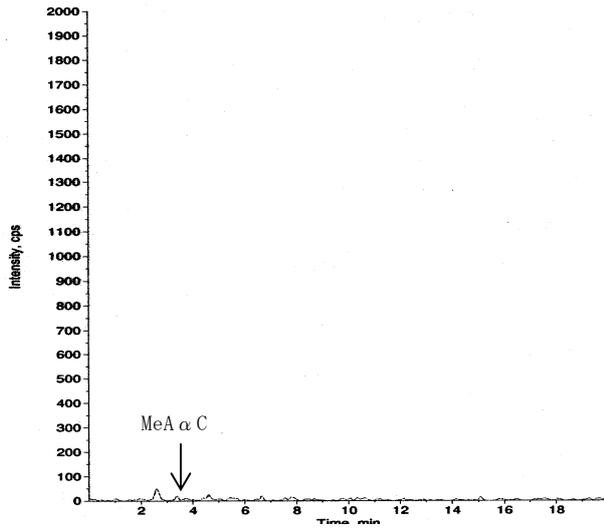


図-36 TDS11群 (MeA α C) 無添加

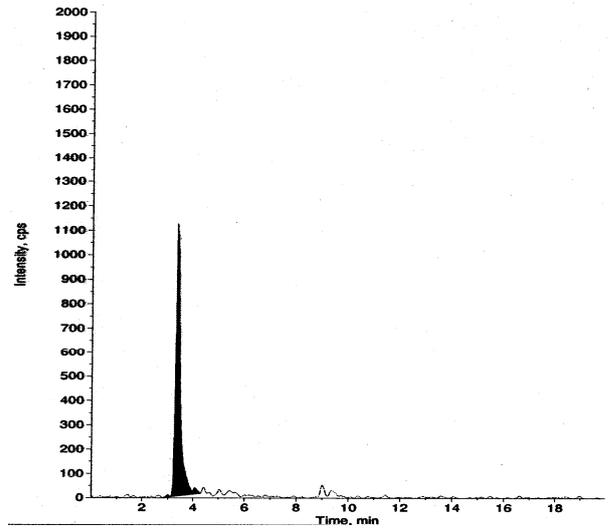


図-37 TDS11群 (MeA α C) 添加 (10 ng/g)

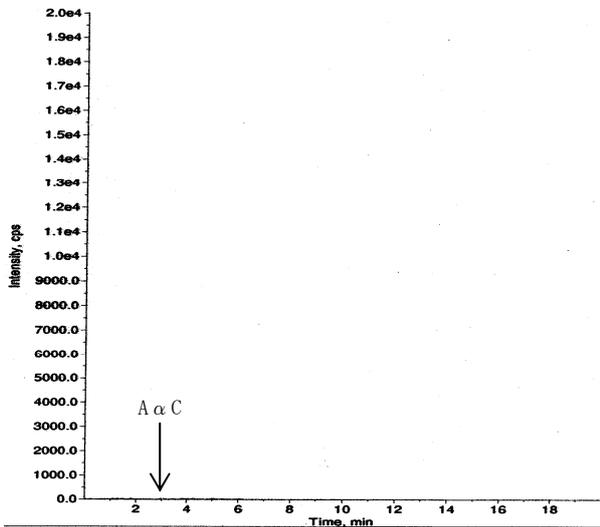


図-38 TDS11群 (A α C) 無添加

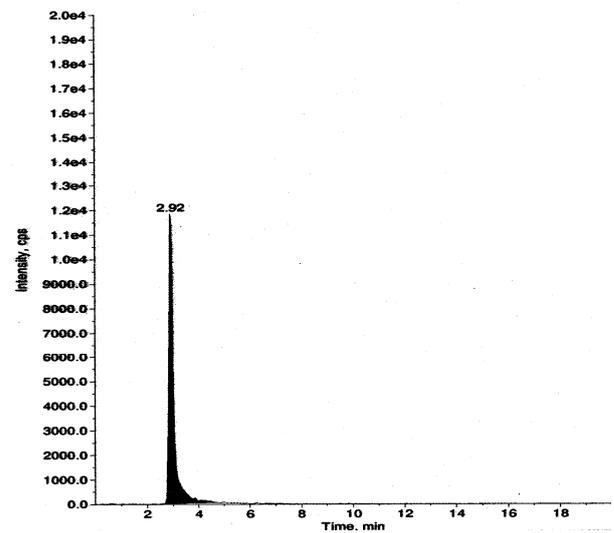


図-39 TDS11群 (A α C) 添加 (10 ng/g)

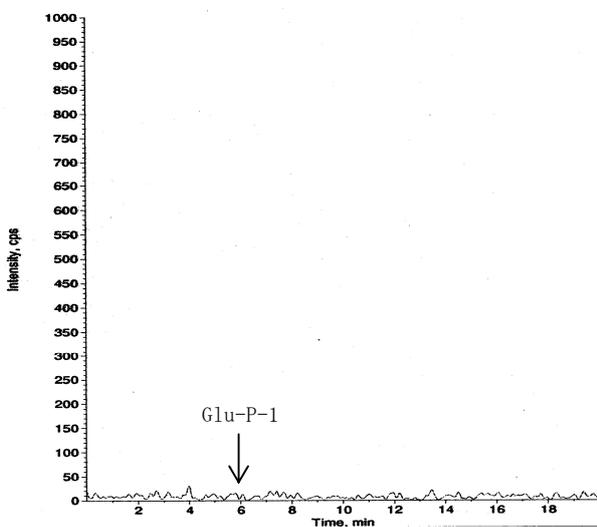


図-40 TDS11群 (Glu-P-1) 無添加

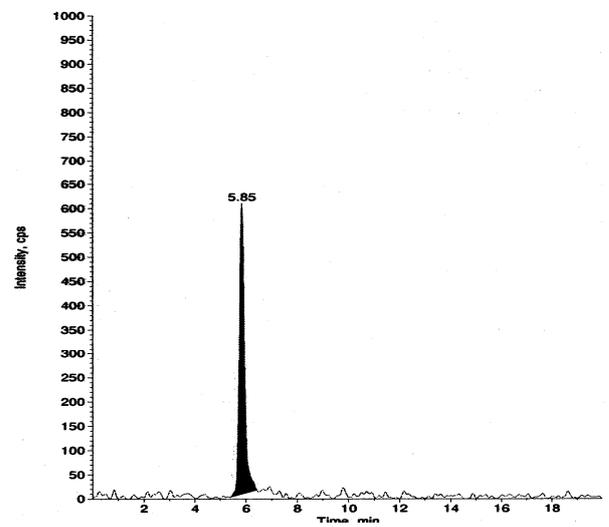


図-41 TDS11群 (Glu-P-1) 添加 (10 ng/g)

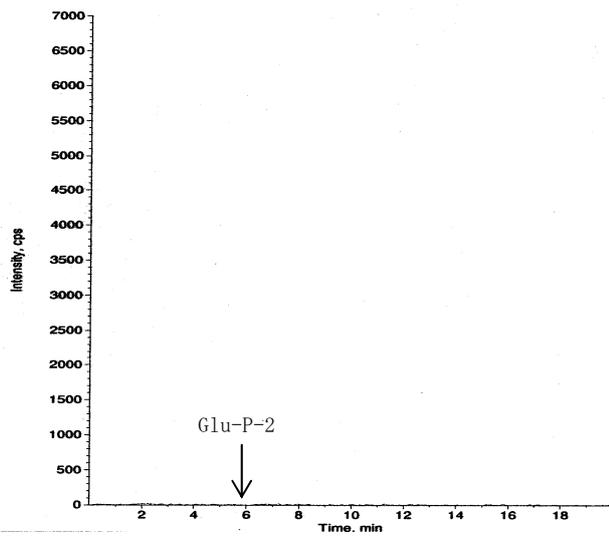


図-42 TDS11群 (Glu-P-2) 無添加

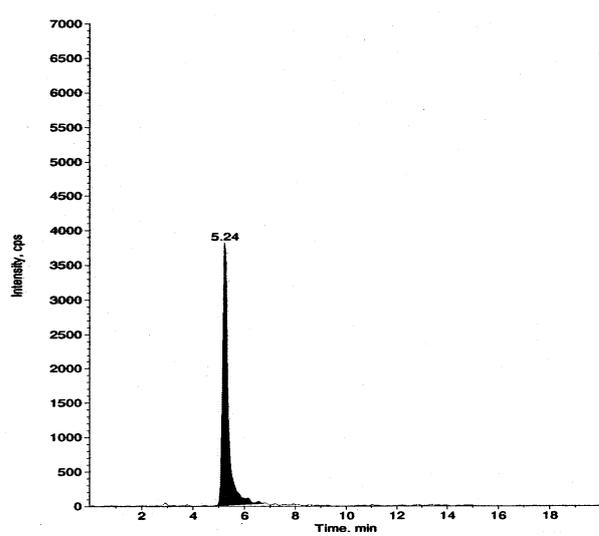


図-43 TDS11群 (Glu-P-2) 添加 (10 ng/g)

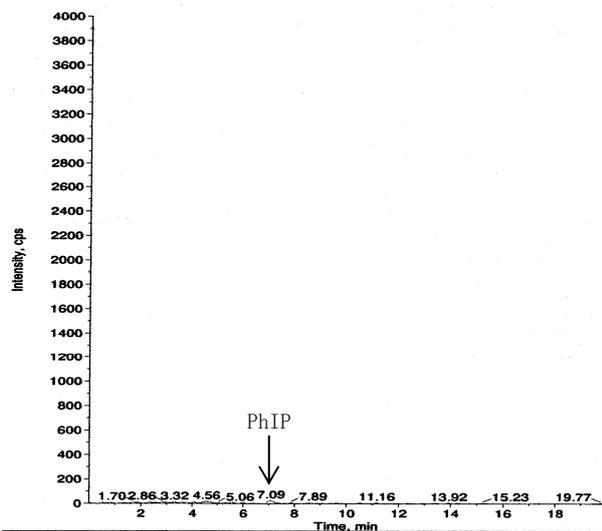


図-44 TDS11群 (PhIP) 無添加

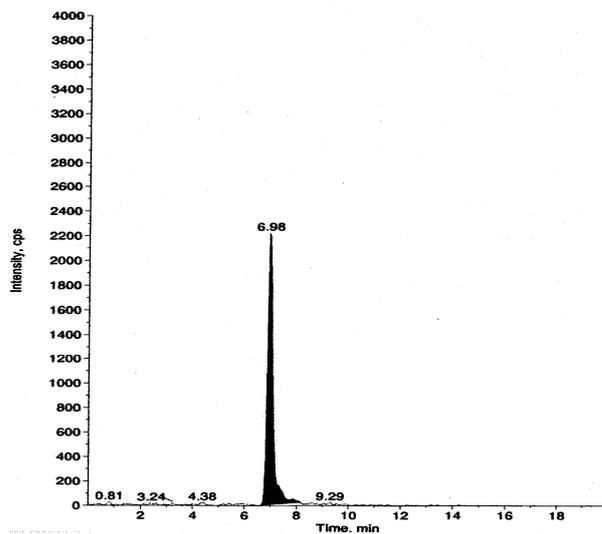


図-45 TDS11群 (PhIP) 添加 (10 ng/g)

8.2 用語の解説

トータルダイエツスタディ (Total diet study)

市場で売られている広範囲の食品を対象とし、食品添加物や農薬などの化学物質を実際にどの程度摂取しているかを把握するために、加工・調理によるこれらの物質の増減を考慮に入れて行う摂取量の推定方法のことをいう。トータルダイエツスタディには、「マーケットバスケット方式」と「陰膳(かげぜん)方式」の2種類がある。

- ・ マーケットバスケット方式

食品添加物や農薬などの化学物質をどの程度摂取しているかを把握するため、国内で流通している食材を用いて平均的な食事を調製しを購入し、その中に含まれている化学物質の量を測定し、その結果に国民健康・栄養調査に基づく食品の喫食量に乗じて摂取量を推定する手法である。

- ・ 陰膳方式

調査対象者が食べた食事と全く同じものの1日分を食事試料として、食事試料全体を一括して分析し、1日の食事に含まれる食品添加物や農薬などの化学物質摂取量を総量として測定する。これにより、調査対象者が食べた食品に由来する化学物質の摂取量を推定する方法である。通常は、調査に協力してもらう家庭で1人前多く食事をつくってもらい、それを試料とする。

注) 本試験では、マーケットバスケット方式を採用し、食品群については、国民健康・栄養調査の分類に従い、14群として分析した。

多孔性ケイソウ土カラム (Porous diatomaceous earth column)

ケイソウ土は多孔質で吸水性がある。この性質を利用し、精製されたケイソウ土が分析用に使用される。このケイソウ土を多孔性ケイソウ土といい、多孔性ケイソウ土をプラスチック製(またはガラス製)の筒に詰めたものを多孔性ケイソウ土カラムと一般に呼称し、保水性を利用し、従来の分液ロートを使用した液々分配の代替法として用いられる。すなわち、水溶液中の試料をケイソウ土に保持させ、有機溶媒を流して目的物質を有機溶媒に移行させる。これらの操作を、「多孔性ケイソウ土カラムによる抽出」あるいは「多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー」などという。

市販品として、メルク社のエクストレルート(Extrelut)など多数あるが、本調査では、ジーエルサイエンス社のK-Soluteを用いた。

固相カートリッジカラム (Solid phase cartridge column)

近年、分析法の簡便化と安全性のため、従来のシリカゲル等の担体をガラス製のクロマト管に充填し、比較的大量の有機溶媒を用いる精製法(カートリッジカラムに対して、オープンカラムと呼称されることもある。)に代わり、対象物質の前処理における精製操作で汎用されている使い捨ての器材である。プラスチック製の容器(注射器型や上下を細くし中間部を膨らませた筒状のものがある)に、従来型の充填剤(白色シリカゲル等の固体)を詰めたものである。使い捨てという簡便さ、従来型が充填剤を5~10g使用するところを1g以下の内容量であるため、使用する有機溶媒が少ない(通常10ml以下、従来

型は 100 ml 前後)などの利点がある。各種の製品が市販され、対象物質の性質と対象検体中の除去したい成分の種類により使い分ける。

本試験で使用した「PSA カートリッジ」は、充填剤として弱塩基性陰イオン交換樹脂を用いた製品、「SCX カートリッジ」は強酸性陰イオン交換樹脂を充填した製品である。

内標準物質 (Internal Standard)

本調査で使用したクロマトグラフィーなどの分析法は、重量法(水分のように重さを測定して行う分析)のような直接分析法と異なり、既知濃度を持つ標準品を物差しとして試料中の対象物質濃度を定める間接分析法である。このとき用いる標準品は、試料とは別の処理で調製するため、外部標準物質という(通常、外部という言葉は省略される。)。これに対し、分析操作中に試料とともに挙動するよう試料に加える物質を内標準物質という。内標準物質は、標準物質と挙動が非常に類似しているものを使用する(最も類似しているのが安定同位体標識内標準物質)。内標準物質は、測定に用いる外部標準物質溶液(通常標準溶液という)にも加え、分析操作中に試料とともに行動してきた内標準物質の変化量を補正するのが一般的である。

さらに、試料に添加する内標準物質以外に、添加された内標準物質の回収率を確認するために、最終測定溶液へ(もちろん標準溶液にも)加える第二の物質も内部標準物質という場合がある(GC など感度が測定時に変動する場合に使用する)。この場合、専門的には、試料に添加する内標準物質を「サロゲート」「クリーンアップ内標」、最終測定溶液に加える内標準物質を「シリンジ内標」ということがある。

一般に、内標準物質は、「内標」と略して表現される。また、内標を使用しない測定法を「絶対検量線法」と呼び、内標を使用する測定法を「内標法」、「内標準法」などと呼ぶ。

添加 (spike)

あるものに別のものを加えることを添加という。本調査において、添加は、試料に内標準物質を溶液として少量加えた場合、あるいは添加回収試験において、標準物質を同様に加えた場合に使用している。

日本語では、試料を水で希釈するときなどにも「水を添加」という表現を用いる場合もあるように、あるものに別のものを加えるとき全てに「添加」という用語を使用する。一方、英語では"add"と"spike"として使い分けられる。一般的には、見た目の容量(または質量)が変化するような添加には"add"を用い、内標準物質添加のように少量(この場合数 μL)添加する場合"spike"が使用される。

同位体希釈法 (Isotope dilution method)

内標準物質として、対象物質の安定同位体標識化合物を用いる分析手法を簡略化して表現する場合に用いられる用語である。

安定同位体標識化合物 (stable isotope labelled compound)

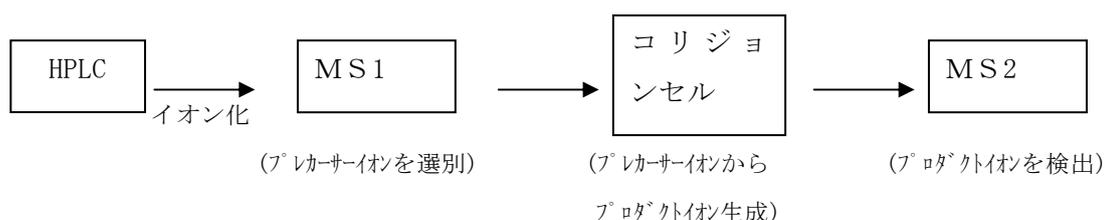
放射性同位体は放射能を放出して壊変するが、それに対し、安定同位体は、放射能を持たない天然に存在比の低い同位体で、重水素 (^2H) や炭素 ^{13}C などがある。安定同位体標識化合物は、化合物中の水素 (H) や炭素 (^{12}C) を重水素 (^2H) や炭素 ^{13}C に置換した化合物で、質量分析などでトレーサー (サロゲート) として用いられる。

LC/MS/MS

液体クロマトグラフ-質量分析計 (または液体クロマトグラフィー-質量分析法) の略称である。英語では、Liquid Chromatograph (-y) / Mass Spectrometer (-try) であり、頭文字をとり LC/MS または LC/MS/MS と略される。LC/MS/MS は、Mass spectrometer が二つ連なっている装置である。LC/MS/MS は、自転車になぞらえてタンデム型 LC/MS と呼ばれる。

ガスクロマトグラフ-質量分析計は GC/MS と略し、ダイオキシン等の測定に汎用されてきた。これに対し、GC/MS で測定困難な高沸点化合物や高温で不安定な物質のために用いられる比較的歴史の浅い機器である

[LC/MS/MS] の構成]



1 台目の質量分離部 (MS1) で特定のイオン種 (プレカーサーイオン) を選択し、次に、コリジョンセル (衝突室) でアルゴン (Ar) や窒素 (N_2) などの不活性ガスとの衝突によってイオンを活性化し、強制的にエネルギーを付与して断片化させる (プロダクトイオン)。このプロダクトイオンを 2 台目の質量分離部 (MS2) で測定する。

コリジョンガス (Collision gas)

LC/MS/MS では第一のイオン化で生成したプレカーサーイオン [通常分子に陽子 (プロトン) が 1 個付加したもの、または電子が 1 個脱離したもの] を、コリジョンセル (衝突室) 内でエネルギー (コリジョンエネルギーという) を与え、プレカーサーイオンをアルゴンや窒素などの不活性ガスと衝突させ解離を起こさせる (このとき生成するイオンがプロダクトイオン)。そのとき用いられる不活性ガスがコリジョンガスである。

イオン化法 (Ionization method)

通常の測定対象化合物は電氣的に中性である。これを検出測定に利用するため、電荷を持たせ電流が流れるようにしそれを増幅して信号として観測することが質量分析には必要である。そのためにイオン化 [化合物が陽子付加 (+) に荷電) または電子放出 (-) に荷電) すること] させる必要がある。そのための手法をイオン化法という。

LC/MS におけるイオン化は、大気圧イオン化法 (API; Atmospheric pressure ionization) であり、現在 API には主に 2 つのインターフェース (イオン化し質量検出器部へ送る部分)。

HPLC 部と Mass 部を連結する部分)がある。イオン性・高極性化合物に有効なエレクトロスプレー法 (ESI ; Electrospray ionization) と大気圧化学イオン化法 (APCI ; Atmospheric pressure chemical ionization) がある。APCI は主に低・中極性の化合物に適していて、試料溶液をヒーター中 (400℃程度に加熱) に N₂ ガスなどを用いてスプレーし、溶媒と試料分子を気化させコロナ放電によってイオン化する。HCA 類は、比較的イオン化しやすい化合物であるため ESI が使用される。

カラム (column)

物質の持つ極性[水に対する親和性の度合で、水になじみやすい物質を極性物質、逆に油になじみやすいものを非(無)極性物質という]や溶解性を利用して、ある担体(粒子や粉末などの固体)とある液体(移動相ともいう)を組み合わせ、分離する手法をカラムクロマトグラフィーという。このカラムクロマトグラフィーに用いられる担体を詰めたものをカラムという。

本調査では、カラムクロマトグラフィーを、精製におけるカートリッジカラム、LC/MS/MS のうち分離の部分(HPLC)に使用している。LC/MS/MS で使用したカラムは、金属製の細長い筒に化学物質の粉体(シリカゲル表面にペンタフルオロフェニル基を結合させたもの)が担体として詰められている。

移動相 (mobile phase)

カラムクロマトグラフィーで担体である固定相(カラム)に対して、移動している液体を移動相という。ガスクロマトグラフィーでは、移動相は窒素ガスまたはヘリウムガスなどの気体である。

本調査では、カートリッジカラムによる精製に使用した洗浄溶媒、溶出溶媒も広義には移動相に含まれるが、一般的には、HPLC でポンプにより固定相のカラムに通液する溶媒のことを移動相と呼ぶことが多い。

マトリックス (matrix)

英和辞書では、「基質」「母体」などと訳されるように、分析する試料そのものと考えても良いが、分析上では、測定対象とする物質以外の試料成分のことをマトリックスと総称する。この用語の一般的用法としては、対象物質以外の試料成分のうちで測定の妨害となる成分を特にマトリックスと呼ぶことが多い。

検出限界 (Limit of Detection, LOD)

対象物質を検出できる最小量(最小濃度)を、検出限界という。

従来は、標準溶液の S/N から理論的に S/N=3 の応答から定義されていたが、近年では、試料マトリックスの影響を考慮した検出限界の設定が多くなってきた。

(注：S/N とは、Signal to noise ratio で、測定機器のノイズレベルと対象物質の信号との比である。S/N=3 の場合、対象物質の応答値(S)がノイズ(N)の 3 倍という意味である。)

試料からの最終測定溶液のノイズレベルの標準偏差の 3 倍から、分析法の希釈率(試料を X g 採取し、Y ml とした場合、Y/X が希釈率)から算出する場合も多く報告されている。回収率が安定している場合、検量線の傾きと残差の標準誤差を用いて求める方法もある。また、定量限界付近の測定値のバラツキ(標準偏差)から、検出限界を推定する方法もある。本調査では、以下に示す方法で定量限界付近の測定値のバラツキから検出限界を求めた。

定量限界値付近の濃度に調整(添加し)した試料を用いて、分析法に従って分析する。この操作を 7 回以上繰り返して、その時の測定値の標準偏差から次式により分析方法の検出限界(LOD)を求める。

$$LOD = 2 \times t_{(n-1, 0.05)} \times s$$

ここで、LOD は分析方法の検出限界値、 $t_{(n-1, 0.05)}$ は次表に示す通り、危険率 5%(信頼限界 95%)、自由度 n-1 の片側 t 値、s は標準偏差である。誤って陽性と判断する確率と誤って陰性とする確率の二つの誤る確率があるため、危険率 5%片側 t 値に 2 をかける。3s、3.3s などを用いる場合もある。3.3 は n-1 が∞のときの t-値を用いた場合に相当する。

t-分布表

自由度 ν (n-1)	α							信頼水準
	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001	
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005	両側 片側
		95%		99%				
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.309	636.619	
2	1.886	2.92	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599	
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924	
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.61	
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869	
6	1.44	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959	
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408	
8	1.397	1.86	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041	
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.25	4.297	4.781	
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587	
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437	
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.93	4.318	
13	1.35	1.771	2.16	2.65	3.012	3.852	4.221	
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.14	
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073	
16	1.337	1.746	2.12	2.583	2.921	3.686	4.015	
17	1.333	1.74	2.11	2.567	2.898	3.646	3.965	
18	1.33	1.734	2.101	2.552	2.878	3.61	3.922	
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883	
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.85	
21	1.323	1.721	2.08	2.518	2.831	3.527	3.819	
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792	
23	1.319	1.714	2.069	2.5	2.807	3.485	3.768	
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745	
25	1.316	1.708	2.06	2.485	2.787	3.45	3.725	
120	1.289	1.658	1.98	2.358	2.617	3.16	3.373	
∞	1.282	1.645	1.96	2.326	2.576	3.09	3.291	

n ; 試験の回数または測定値の数、太字の列の t-値を使用する。

定量限界(Limit of Quantitation、LOQ)

定量限界とは、試料に含まれる分析対象物分析法の真度(回収率)と精度が、許容される範囲にあつて、数値化が可能な最低の量(濃度)のことである。検出限界と同様に① S/N=10に相当する濃度とする方法、② 検量線の残差の標準誤差と傾きで求める方法、③ 定量限界付近の測定値のバラツキから推定する方法がある。

本調査では、定量限界付近の測定値のバラツキから定量限界を求めた。

定量限界値付近の濃度に調整(添加し)した試料を用いて、分析法に従って分析する。この操作を7回以上繰り返して、その時の測定値の標準偏差から次式により分析方法の定量限界を求める。

$$LOQ=10 s$$

s : 標準偏差

真度(truness)

真度とは、正確さ(Accuracy)をあらわす実測の指標である。測定値が実際の値(真値)とどの程度近いかを示す尺度である。真値が決定されているもの(認証標準物質)を測定したときの測定値との差である。一般には認証値(付与値)を100%としたときの回収率で表記する。

實際上真値の定められた試料が利用(入手)できないため、対象とする試料に対象物質の既知量を添加し分析(添加回収試験と呼ばれる)を行い、どのくらい回収されたかを示す回収率を求め、この回収率を真度とすることが一般的に行われている。

一元配置分散分析(one factor analysis of variance)

ある特性値に対して1つの因子の影響を調べる場合に用いる手法で、各集団のデータが正規分布をしていて、その分散が等しいと考えられる場合に用いられる分散分析。

実際には、次の例で示すようなエクセル内に付属するツール(ソフト)を使用し、併行精度と室内精度を求めた。

分析値

8月16日	8月19日	8月25日	8月26日	9月1日
0.165	0.225	0.188	0.191	0.188
0.146	0.187	0.179	0.189	0.176
全平均				0.1834
全標準偏差				0.020238577
RSDr%				11.0 %

分散分析：一元配置

グループ	標本数	合計	平均	分散
列 1	2	0.311	0.1555	0.0001805
列 2	2	0.412	0.206	0.000722
列 3	2	0.367	0.1835	0.00004050
列 4	2	0.38	0.19	0.00000200
列 5	2	0.364	0.182	0.00007200

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.0026694	4	0.00066735	3.280973451	0.1123	5.19216
グループ内	0.001017	5	0.0002034			
合計	0.0036864	9				

並行精度

$$=\sqrt{0.000203}$$

$$= 0.014261837$$

$$\text{RSDr}\% = 7.8 \%$$

$$\text{日間の分散}(\sigma_d^2) = (0.00066735 - 0.0002034) / 2 =$$

$$0.000231975$$

$$\sigma_d = 0.015230726$$

$$\text{室内精度} = \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} =$$

$$0.020865642$$

$$\text{RSD}_R\% = 11.4 \%$$

この例では、同日間の2連併行のバラツキを併行精度とし、異日間(5日間)のバラツキを室内精度としている。

併行精度 (Repeatability)

精度はそれぞれの分析値が一致する程度(あるいはばらつく程度)である。単回の試験であれば、測定値の標準偏差を精度(例えば、平均値±標準偏差)として用いる。分析法の精度を求める場合、標準偏差は濃度に依存するため相対標準偏差(標準偏差/平均値×100、RSD%)を精度とするのが一般的である。相対標準偏差は変動係数(CV%)と同じ意味である。

併行精度とは、同じ分析者が同じ試験条件で同じ機器を用いて測定したときの精度のことをいう。本調査では、一日(同時)に併行して試験したときのバラツキを併行精度とした。

室内精度 (Intermediate reproducibility)

再現性(reproducibility)は、異なる試験室で、異なる分析者が、異なる日時に異なる機器を用いて行ったときの精度である。現実にはコラボ試験(数機関による共同試験)によってのみ得られる精度である。この室内精度という用語は、試験室内の再現性(日間)を表わすために用いられる。

本調査では、再現性条件のうち日時だけを変化させた場合の精度を室内精度とした。

以 上

トータルダイエット試料の調製法

群	分類	食品	配合量(g)	調理法
1	米及び加工品	精白米(A)	326.9	水で4回洗い、水を加え30分後に電気炊飯器で炊く。
		精白米(B)		
		精白米(C)(無洗米)		水を加え30分後に電気炊飯器で炊く。
		赤飯	5.9	
	合計		332.8	
2	米以外の穀類, 種実類及びいも類	小麦粉	3.0	水でこね, ホットプレート(210℃,3分)
		食パン(A)	31.1	そのまま
		食パン(B)		そのまま
		ブドウパン		そのまま
		あんパン	5.4	そのまま
		クリームパン		そのまま
		うどん	40.5	沸騰水で2分間茹でる。茹で汁は捨てる。
		中華そば		
		そうめん		
		即席中華めん	3.7	3袋(具を除く)に沸騰水を注ぎ4分間放置し, 汁を切る
		スパゲティ	10.9	沸騰水中で7分間茹で, 汁を切る。
		マカロニ		沸騰水中で7分間茹で, 水洗後汁を切る。
		ふ	5.8	水戻し後, 水で5分間煮る。煮汁を捨てる。
		そば	9.4	沸騰水中で2分間茹で, 汁を切る。
		コーンフレーク	0.7	そのまま
		押麦	1.8	沸騰水中で5分間茹で, 汁を切る。
		サツマイモ	6.1	水洗し皮付きのまま8mmに輪切りし, 沸騰水で5分間煮る。煮汁は捨てる。
		ジャガイモ(A)	29.2	水洗後皮をとり, ラップに包んで電子レンジ(500W,5分)
		ジャガイモ(B)		
		乾燥マッシュポテト		湯もどしする。
		サトイモ	24.8	皮をむき, 1cmに輪切りし沸騰水で5分間煮る
		ナガイモ		皮を除く
		こんにゃく		湯で5分間煮て, 煮汁を捨てる
		かたくり粉	1.2	そのまま
		落花生	1.8	そのまま
		甘ぐり		そのまま
		合計		175.4

3	砂糖・菓子類	上白糖	6.7	そのまま	
		グラニュー糖		そのまま	
		揚菓子	11.0	そのまま	
		米菓子			
		生菓子			
		甘納豆			
		シュークリーム	7.2	そのまま	
		ロールケーキ			
		ビスケット	1.6	そのまま	
		キャンデー	0.3	そのまま	
		ポテトチップス	5.3	そのまま	
		チョコレート		そのまま	
	合計		32.1		
4	油脂類	バター	1.3	そのまま	
		マーガリン	1.1	そのまま	
		サラダ油	8.4	そのまま	
		ゴマ油		そのまま	
		ラード	0.2	そのまま	
	合計		11.0	そのまま	
5	豆類及び加工品	きなこ	1.8	そのまま	
		ゆで大豆			
		絹ごし豆腐(A)	35.9	そのまま	
		絹ごし豆腐(B)			
		もめん豆腐			八つ切りし、沸騰水で5分間煮、煮汁を捨てる。
		焼き豆腐			八つ切りし、沸騰水で5分間煮、煮汁を捨てる。
		油揚げ	6.8	六つ切りし、沸騰水で5分間煮、煮汁を捨てる。	
		がんもどき		沸騰水中で5分間煮る。煮汁は捨てる。	
		納豆(A)	8.2	そのまま	
		納豆(B)			
		豆乳	5.2	そのまま	
		煮豆(A)	1.7	そのまま	
	煮豆(B)				
合計		59.6			

6	果実類	いちご	0.3	へたをとる。
		みかん(A)	27.9	皮をむく。
		みかん(B)		
		バナナ	10.9	皮をむく。
		りんご	29.7	皮をむき、芯をとる。
		パイナップル	39.4	皮をむき、芯をとる。
		メロン		皮をむき、種をとる。
		キウイフルーツ		皮をむく。
		いちごジャム	1.1	そのまま(瓶詰め)
		ジュース(濃縮還元)	16.1	そのまま
		オレンジジュース		
合計		125.4		
7	緑黄色野菜類	トマト	16.1	水洗後、葉柄をとる。
		にんじん(A)	20.3	水洗後皮をむき、1cm 厚に切り、沸騰水中で 10 分間煮る。煮汁は捨てる。
		にんじん(B)		
		ほうれん草	17.7	根茎をとり、水洗後沸騰水中で 10 分間煮る。煮汁は捨てる。
		ピーマン	3.4	水洗後葉柄と種を除き、5cm 角に切りホットプレートで 5 分間焼く。
		ブロッコリー	35.2	小房にわけ、沸騰水で 3 分間茹でる。
		カボチャ		水洗後、種とわたを除き 5mm の厚さに切り、ホットプレートで 5 分間焼く。
		ニラ		水洗後、ホットプレートで 3 分間焼く。
		小松菜		根茎を切り、水洗後沸騰水中で 4 分間茹でる。
		野菜ジュース	7.6	そのまま
合計		100.3		

8	その他の野菜類, き のこ類, 海藻類	きゃべつ	19.8	そのまま
		きゅうり	9.3	そのまま
		大根(A)	36.1	皮をむき, おろす。
		大根(B)		皮をむき 1.5cm 厚に切り, 沸騰水中で 15 分間煮る。煮汁は捨てる。
		たまねぎ	28.1	頭部と根盤部を除き, 皮をむいて薄切りし 沸騰水中で 6 分間煮る。煮汁は捨てる。
		白菜	19.2	水洗後 4cm 角に切り, 沸騰水中で 5 分間煮 る。煮汁は捨てる。
		もやし	47.9	水洗後, ホットプレートで 3 分間焼く。
		ごぼう		皮をそぎ, 1cm 厚に切り沸騰水中で 10 分間 煮る。煮汁は捨てる。
		なす		水洗後へたをとり, 縦に 8 等分しホットプ レートで 5 分間焼く
		白菜塩漬け	6.3	そのまま
		干しダイコン, たくあん 漬け	13.2	そのまま
		なめこ	15.3	沸騰水中で 2 分間煮る。煮汁は捨てる。
		しめじ		水洗後石づきをとり, 沸騰水中で 5 分間煮 る。煮汁は捨てる。
		昆布	13.9	そのまま
		ひじき		水もどし後, 沸騰水中で 5 分間煮, 水きり する。
のり佃煮	そのまま			
合計		209.1		
9	嗜好飲料	日本酒(A)	12.6	そのまま
		日本酒(B)		
		ビール(A)	63.1	
		ビール(B)		
		ワイン	22.3	
		ウーロン茶	272.5	
		緑茶(A)		
		緑茶(B)		
		コーヒー(A)	106.4	
		コーヒー(B)		
		炭酸飲料	63.9	
合計		540.8		

10	魚介類	マアジ	11.5	3枚におろし、可食部をホットプレートで8分間焼く。
		サバ		3枚におろし、可食部を沸騰水中で10分間焼く。
		サケ	3.4	そのまま
		カレイ	7.4	5枚におろし、可食部を沸騰水中で3分間煮る。煮汁は捨てる。
		タラ		可食部を沸騰水中で3分間煮る。煮汁は捨てる。
		マグロ	7.8	そのまま
		アナゴ(生)	7.6	ホットプレートで4分間焼く。
		イサキ		3枚におろし、可食部を沸騰水中で3分間煮る。煮汁は捨てる。
		アサリ	4.7	5分間茹で、可食部を取る。
		ホタテガイ		そのまま
		たこ	6.8	そのまま
		カニ	6.1	そのまま
		塩サケ	17.7	ホットプレートで6分間焼く。
		アジ開き		ホットプレートで4分間焼く。
		みりん干し		ホットプレートで4分間焼く。
		イワシ丸干し		頭を除き、ホットプレートで4分間焼く。
		イカ味付け缶詰	2.6	そのまま
		マグロ缶詰		
		佃煮	0.4	そのまま
		ちくわ	8.3	沸騰水中で3分間煮る。煮汁は捨てる。
さつま揚げ		沸騰水中で3分間煮る。煮汁は捨てる。		
魚肉ソーセージ	0.5	そのまま		
合計		84.8		
11	肉類, 卵類	牛肉(肩ロース)	15.1	ホットプレートで3分間焼く。
		牛肉(モモ,カタ,バラ)		ホットプレートで4分間焼く。
		豚肉(ロース)	32.2	ホットプレートで5分間焼く。
		豚肉(バラ)		ホットプレートで7分間焼く。
		ロースハム	11.5	そのまま
		ウィンナー		ホットプレートで2分間焼く。
		その他の畜肉	0.4	骨を除き、ホットプレートで3分間焼く。
		鶏肉(モモ)(A)	17.4	沸騰水中で10分間茹でる。
		鶏肉(モモ)(B)		
		豚ホルモン	1.4	ホットプレートで3分間焼く。
		鶏卵(A)	33.3	生
		鶏卵(B)		生
		合計		111.3

12	乳及び乳製品	牛乳(A)	98.2	そのまま
		牛乳(B)		
		牛乳(C)		
		チーズ(プロセス)	2.2	そのまま
		ヨーグルト	25.1	そのまま
		乳酸菌飲料		
		ホイップクリーム	12.2	そのまま
	アイスクリーム	そのまま		
合計		137.7		
13	調味料・香辛料類	ウスターソース	2.0	そのまま
		しょう油(A)	18.1	そのまま
		しょう油(B)		
		食塩	1.5	そのまま
		マヨネーズ	3.2	そのまま
		米みそ(A)	12.9	そのまま
		米みそ(B)		
		焼肉のタレ	56.6	そのまま
		めんつゆ		
		ぼん酢		
		ドレッシング		
		カレールウ		
	練りワサビ	0.2	そのまま	
合計		94.5		
14	飲料水			水道水