



図11-2-4 フタル酸ジイソノニルエステルのガスクロマトグラム

別添資料（「試薬・標準品等のリファレンス・センターに関する検討」）

残留農薬検査に使用する標準品に関するアンケート

（該当する項目の□にレをつけて下さい）

対象農薬等：

1. 機関

公立検査機関、 指定検査機関

2. 残留農薬検査の有無

残留農薬検査を実施している。

残留農薬検査を実施していない（ご回答が可能な問いにお答え下さい）。

3. 使用している残留農薬検査用標準品（複数回答可）

残留農薬検査用標準品（原末／原液）を秤量して調製

試薬業者が調製した濃度が表示されている標準液を希釈して調製

・この場合には、現在までに使用したことがある業者が調製した標準液の名称を別紙に記載して下さい（業者のカタログの写しでも結構です）。

以下で使用する用語の区別

- ・ 業者が調製した濃度が表示されている標準液
- ・ 検査室で標準品（原末／原液）あるいは業者が調製した濃度が表示されている標準液を使用して調製した保存用の標準原液
- ・ 保存用の標準原液を希釈して調製した標準溶液

4. 標準品（原末／原液）および業者が調製した標準液を購入後、それらの使用期限はどれほどにしていますか（開封後を規定されている機関は、5. の項にご回答下さい）

・ 標準品（原末／原液）：購入後

3か月以内（___か月）、 6か月以内（___か月）、 1年以内（___か月）

2年以内（___か月）、 3年以内（___か月）、 3年以上（___か月）

標準品それぞれで異なる

・ 試薬業者が調製した標準液：購入後、

3か月以内（___か月）、 6か月以内（___か月）、 1年以内（___か月）

2年以内（___か月）、 3年以内（___か月）、 3年以上（___か月）

標準品それぞれで異なる

・ 標準品によりそれぞれ異なる場合には、それぞれの標準品について別紙に記載して下さい（業者のカタログの写しでも結構です）

5. 購入した標準品（原末／原液）および業者が調製した標準液の容器を開封後、それらの使用期限は、どれほどにしていますか。

・標準品（原末／原液）：開封後、

3か月以内（__か月）、 6か月以内（__か月）、 1年以内（__か月）

2年以内（__か月）、 3年以内（__か月）、 3年以上（__か月）

標準品それぞれで異なる

・試薬業者が調製した標準液：開封後、

3か月以内（__か月）、 6か月以内（__か月）、 1年以内（__か月）

2年以内（__か月）、 3年以内（__か月）、 3年以上（__か月）

標準品それぞれで異なる

・標準品によりそれぞれ異なる場合には、それぞれの標準品について別紙に記載して下さい（業者のカタログの写しでも結構です）。

6. 調製した標準原液の使用期間は、どれほどにしていますか。

・検査室で標準品（原末／原液）から調製する場合；調製後、

3か月以内（__か月）、 6か月以内（__か月）、 1年以内（__か月）

2年以内（__か月）、 3年以内（__か月）、 3年以上（__か月）

標準品それぞれで異なる

・購入した調製済み標準液を希釈して調製する場合；調製後、

3か月以内（__か月）、 6か月以内（__か月）、 1年以内（__か月）

2年以内（__か月）、 3年以内（__か月）、 3年以上（__か月）

標準品それぞれで異なる

・標準品によりそれぞれ異なる場合には、それぞれの標準品について別紙に記載して下さい（業者のカタログの写しでも結構です）。

7. 上記の標準原液の使用期間はどのような方法で設定していますか。

特に設定方法は定めていない。

標準作業手順書がある（できれば写しを添付して下さい）。

その他（具体的に記入して下さい。資料の添付でも結構です）。

8. 購入した調製済み標準液から標準原液を調製している場合には、濃度の検証は、どの様にしていますか。

製造業者が表示している濃度を使用して算出している。

自施設で濃度を検定している。

その他（具体的に記入して下さい。資料の添付でも結構です）。

9. 業者による調製済み標準液について

9-1. 業者の濃度表示は、

- 信用できる。
 - 信用できない。
 - 信用できない標準溶液が一部ある。
(具体的に記入して下さい。業者のカタログの写しでも結構です)。
-
-

9-2. 業者の表示濃度を自施設で、

- 将来とも、あらためて濃度を検定する予定はない。
 - 現在は検定していないが、将来は濃度を検定する予定である。
 - 検定している(具体的に記入して下さい。資料の添付でも結構です)。
-
-

9-3. 業者の表示濃度を

- 検定する方法を統一化して欲しい(具体的な方法についてご意見を記入して下さい)。
-
-
-

- 第三者機関が検定して欲しい(具体的な方法について意見を記入して下さい)
-
-
-

10. 標準品(原末/原液)について

10-1. 製造業者の純度表示は、

- 信用できる。
 - 信用できない。
 - 信用できない標準品(原末/原液)が一部ある。
(具体的に記入して下さい。業者のカタログの写しでも結構です)。
-
-
-

10-2. 異性体が存在する標準品（原末／原液）の供給に関してご意見をご記入下さい。
（資料の添付でも結構です。）

11. 標準品の供給に関してご意見があれば、記入して下さい。
（資料の添付でも結構です）。

12. 標準品を購入後の検査施設での標準品の管理方法に関してご意見があれば、記入して下さい（資料の添付でも結構です）。

13. お差しつかえなければ貴機関名をお書き下さい。
最終的には機関名を公表いたしません。が、ご回答について照会する可能性とご回答を集計後に結果を報告する場合がありますので。勿論、無記名でも結構です。

〒 ご住所 :	
機 関 名 :	_____
担 当 者 :	_____
電話, FAX :	_____

ご協力、ありがとうございました。

Ⅱ-3. 精度管理用試料における添加物質に対する食品成分の影響に関する検討

協力研究者 内山貞夫（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
食品衛生 外部精度管理調査事業部長）
福原克治、勝村利恵子、高坂典子、大島赴夫、鈴木達也、常磐俊之

A. 研究目的

食品衛生検査施設を対象とする外部精度管理調査の調査試料の作製に関する具体的な研究はきわめて少ない。この調査のためには、調査対象となる食品添加物、汚染物及び微生物等を含む試料中の対象物の均質性と安定性の高い調査試料を作製提供することが求められる。その目的のために、本年度はできるだけ実際の食材に近い調査試料の作製方法を確立することを目指し、試作した調査試料の均質性や安定性を測定し、その実用性を検討した。その内容は、

1. 専門家に対するヒアリング調査によって具体的な精度管理調査試料の作製法について意見を聴取し、今後の方向性を検討した。

2. 理化学的検査用調査試料について、保存料、重金属、残留農薬及び残留動物用医薬品検査試料の食材に近い調査試料を作製し、各試料における実用性を検討した。

3. 細菌学的検査用調査試料については、マッシュポテトを培地とする細菌同定の模擬試料において、大腸菌検査及びサルモネラ菌検査についての実用性を検討した。

以下にこれらの概要を述べるとともに、それぞれ詳細については別記する。

B. 研究方法

1. ヒアリング調査

これまで精度管理調査に試みられた調査試料の作成方法と今後の調査試料作製の方向性

について専門家の意見を聴取した。調査内容については「別添1」に示す。

2. 理化学的検査用調査試料の作製

市販味噌中の食品添加物ソルビン酸、清涼飲料水中の重金属（鉛とカドミウム）ならびに精白米中のカドミウム、大豆油中の農薬クロルピリホスとプロチオホスについて食品衛生法に記載される検査法で均質性と安定性を検査し、また、動物用医薬品フルベンダゾールのガラス容器への吸着性を検討した。詳細は「別添2」に示す。

3. 細菌学的検査用調査試料の作製

細菌学的検査用調査試料に関しては、滅菌したマッシュポテト中に *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* および *Salmonella typhimurium* を接種したものを細菌同定用模擬試料とし、大腸菌及びサルモネラ菌の同定検査を実施した。対照として、*Klebsiella pneumoniae*を用いて検討した。またサルモネラ検査についてアンケート調査を行った。詳細については「別添3」に示す。

C. 結果

1. 精度管理調査用試料作製に関するヒアリング調査（別添1）

食品衛生精度管理に関係する専門家からのヒアリング調査の結果、以下の諸点が明らかになった。

食品衛生精度管理の調査試料は、より食材

に近く、安定性と均質性の高い試料であることが求められる。たとえば、理化学的検査用試料としては、各種保存料を含む練り餡や味噌、また用時調製する調査試料として粉碎した食材に亜硝酸または亜硫酸を添加する方法が紹介された。市販味噌中のソルビン酸は、添加量に明確性を欠く調査試料であるので、回収率に対する管理はR管理線のみに対して行われてきた。重金属検査用試料としては、清涼飲料水中の鉛やカドミウムあるいは精白米中のカドミウムの事例が報告された。残農薬検査用試料では、わが国の外部精度管理調査試料の食用油中に溶解された農薬の例が報告された。なお、野菜などの食材の使用は難しいとの意見もあった。残留動物用医薬品検査用試料では、わが国の現行法（ビン毎に乾固状態の医薬品と食肉を封入して送付する方法）が現実的であるとの意見があった。

細菌学的検査用試料では、食品素材に細菌を添加して、安定性の高い調査試料を調製するのは難しく、検討を要すると報告された。細菌数測定では、カカオ外殻粉末やそば粉中の天然汚染生菌数を測定する方法が実用的であると報告された。細菌同定のための試料は従来、通常の培地を用いてきたが、食材の培地としてマッシュポテトの調査試料が有用であることが報告された。

2. 理化学的検査用調査試料の作製方法の検討（別添2）

保存料の調査試料について、ソルビン酸を含む市販味噌を入手し、水蒸気蒸留法による抽出と高速液体クロマトグラフ法の測定によりソルビン酸を定量した結果、平均値 0.545 mg/kg、標準偏差 0.011、変動係数 1.96%とばらつきの少ない試料であり、外部精度管理調査試料として満足すべき試料であった。さらにロット毎(n=10, 1ロット2回測定)の均質性を分散分析法で評価したところ、保存料検査用調査試料として十分に均質であることが

判明した。また、37日間の保存中の変化はほとんどなかった(変化率(%): 102.3%)。重金属の調査試料について、市販の乳酸菌飲料水に鉛及びカドミウムを添加し、その濃度を測定し、均質性と経時的な安定性を調べた。鉛の濃度は、2.52 $\mu\text{g/g}$ に対して、標準偏差 0.01、変動係数 0.40%、カドミウムの濃度は 0.208 $\mu\text{g/g}$ に対して標準偏差 0.01、変動係数 0.48%であり、バラツキの少ない試料であった。また、40日間の保存中の変化はほとんどなかった(変化率(%): 98.5%)。

精白米にカドミウム水溶液を浸漬させ、乾燥させたものを調査試料として、その有用性を調べた。0.5 ppm, 2.0 ppmおよび 4.0 ppmの3濃度のカドミウム水溶液を用いて調製した精白米では、いずれの濃度でも同程度の均質な精白米試料を作製することができた。特に0.5 ppmの濃度ではより一定のカドミウム濃度(精白米に対して同程度の濃度)の試料を作製することができた。残留農薬の調査試料について、大豆油中に一定容のクロルピリホスおよびプロチオホスのヘキサン溶液を添加し調製した調査試料ではそれぞれ 3.13%および 3.67%の変動係数を示し十分満足のいく残留農薬の調査試料であることが判明した。この調査試料は、Codexで提起されている分散分析によるF検定もクリアした(クロルピリホス: $F_{9,10}^9=1.47$; プロチオホス: $F_{9,10}^9=0.37$)。また、28日間の保存中の変化はほとんどなかった(変化率(%): クロルピリホス: 103.3%; プロチオホス: 105.6%)。

残留動物用農薬の調査試料については、予め空のガラス試料びんに動物用医薬品(例えば、フルベンダゾール)を溶かしたメタノール溶液を一定容注入して溶媒を留去し、次いで冷凍肉の一定量を挿入する試料体系をとっている。本研究では、ガラス試料びんに対する動物用医薬品の吸着について検討した。化学物質の吸着を防ぐため不揮発性の溶媒としてグリセリンをメタノールに加えた溶媒系を

採用した結果、グリセリンを添加した方がガラス試料びんからの回収率が低く、フルベンダゾールのメタノール溶液のみの方が良好な回収率が得られることが判明した。

3. 細菌学的検査用調査試料の作製方法の検討 (別添3)

マッシュポテト 1容量と0.1%ペプトン水 5容量の混合またはマッシュポテト 1容量と10%グリセリンを含む0.1%ペプトン水 5容量の混合物をオートクレーブ滅菌(121℃, 20分処理)し、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*を 10^5 cfu/g または 10^6 cfu/g になるよう接種したものを28日間、4℃下で低温保存した。

単独菌接種によるマッシュポテト中での接種菌の安定性については、10%グリセリン添加ペプトン水で調製した試験試料は、無添加試料に比べて接種菌がより安定であることが観察された。そこで保存中のマッシュポテトの変性状態を知るため、マッシュポテトを4℃下で4週間保存し観察したところ、特に変性は認められなかった。しかし、低温保存下でも3週間目から水分含量が減少し、マッシュポテトが乾燥状態になった。従って、グリセリン添加によって水分減少が抑えられることによる菌の安定性が示唆された。

また、グリセリン無添加でも*Escherichia coli*及び*Salmonella typhimurium*のいずれも2週間までは、どの方法でも目的の菌を回収することは可能であったが、グリセリン添加によって3週間までは接種菌の検出が可能であった。サルモネラの検査方法に関するアンケート調査では、汎用される検査採取量、前増菌培養培地、選択・分離培地について回答が得られた。

D. 考察

1. 精度管理調査用試料の作製法のヒアリン

グ調査

精度管理調査試料は、いずれも食材に近い試料の作製が望まれ、目的物質(細菌も含む)の含有分布の均質性も高く、試料中の安定性も高いことが昨年度同様に望まれた。

理化学的検査用試料において、初めて添加量に明確性の欠けるソルビン酸含有味噌が外部精度管理調査に採用された例や、用事調製の調査試料について意見の交換を行った。前者は、統計処理上の問題、管理線の設定について、後者は、小規模の外部精度管理調査の場合には採用できるが、大規模の場合には種々検討しなければならないと考えられた。その他、重金属検査用試料としてカドミウム水溶液を浸漬・乾燥した精白米のように、今後の様々な調査項目に対して適正な食材試料の作製方法を検討することが必要とされた。細菌数測定では、そば粉やカカオ外殻粉末などの天然細菌汚染の試料が有用であること、菌数は対数表示が適切であること、菌数測定には培地の選定が重要であるが、これらは今後の大きな課題であると考えられた。

2. 理化学的検査調査用試料の作製法

市販味噌中のソルビン酸を検査すると、濃度のばらつきが小さく、均質性は良好で、安定性もあることから、大規模な調査試料を要する外部精度管理用調査試料として使用可能と考えられた。

精白米をカドミウム水溶液に浸漬した後乾燥させた試料も、ある一定濃度のカドミウム水溶液(0.5 ppm)の場合には、同程度の含有濃度の精白米の試料を作製できることが判明し、さらに検討すれば精度管理用調査試料として使用可能と考えられた。

残留農薬として有機りん系農薬(クロルピリホス及びプロチオホス)を大豆油に溶解した試料は、従来の残留農薬調査試料と同様に均質性および保存性に優れており、今後の試料の調製法として有用と考えられた。

残留動物用医薬品（フルベンダゾール）では、ガラス試料びんへの吸着が懸念されたので、フルベンダゾールを不揮発性の溶媒グリセリンを含むメタノールに溶解し、その一定容を注入し、溶媒を減圧留去したものについて、フルベンダゾール測定を行い、吸着の割合を調べた。結果として、グリセリンを添加しない方が回収率がよかった。この原因については、今後の課題となった。フルベンダゾールを含むメタノール溶液を用いて調製した調査試料は、均質性ならびに安定性も良好であり、外部精度管理調査試料として有用と考えられた。

今後は、さらに種々の食材を用いる調査試料の作製方法を検討する必要がある。

3. 細菌学的検査用調査試料の作製法

細菌同定検査において、腸内細菌群に属する3菌種を用いて、マッシュポテト中での供試菌の安定性を検討し、日常検査機関で実施されていると思われる検査方法によって作製試料からの試験菌の検出が可能であるかを調べた。各供試菌では、14日間の保存期間中、比較的安定的に生菌数が推移するため模擬調査試料としてマッシュポテトを使用可能と考えられた。さらにグリセリンを添加することにより、より安定した試料の調製が可能であることが示唆された。今後は、試料の作製から、発送、検査の実施までの期間を考慮するとさらに安定性が必要であり、接種菌の接種量を調節することで安定な試料の供給を確保する必要があると考えられた。

E. 結論

食品衛生検査分野での精度管理調査用試料の作製方法については、具体的情報及び報告が乏しく、精度管理実施上の課題となっている。

精度管理調査用試料の作製方法のヒアリン

グ調査では、専門家の今日まで試みられた調査試料の報告と、今後の調査試料のあり方について意見を聴取した。調査試料は、食材試料で対照物質の均質性および安定性の確保が重要であることが確認された。さらに保存性市販味噌中の保存料のように添加量に明確性を欠く試料や用事調製試料の評価方法や可能性について検討した。また、細菌数測定試料では、そば粉やカカオ外殻粉末などの天然微生物汚染の粉体が有用であること、細菌同定では、マッシュポテトを培地とする大腸菌やサルモネラ菌の試料が実用可能との意見が出された。

理化学的検査試料については、保存料ソルビン酸を含む市販味噌の精度管理試料として均質性や安定性を調べてその有用性を確認した。重金属（鉛及びカドミウム）を含む清涼飲料水やカドミウムを含む精白米の調製法ならびに均質性について調べて、その精度管理調査試料として有用性を確認した。残留農薬については、有機りん系農薬クロルピリホス及びプロチオホスを含む大豆油を調製し、その均質性ならびに安定性を調べて試料としての有用性を確認した。残留動物用医薬品検査試料においては、従来課題となっていたガラス試料びん表面への動物用医薬品の吸着について、グリセリン含有メタノール溶液の使用を検討したが、フルベンダゾールの場合、グリセリン使用の有用性は見出だせず、メタノール溶液そのまま吸着性はないことを確認した。細菌学的検査用試料においては、

細菌同定試料として模擬食品、マッシュポテト中の大腸菌やサルモネラ菌などの接種菌の安定性の検討結果、グリセリン添加による保水性の確保と高濃度の菌接種（ 10^8 cfu/g以上）で、それぞれの検査法による同定試料として実用可能であることが示唆された。今後はその他の試供菌の調査試料の作製方法を検討する必要があると望まれる。

Ⅱ－3. 精度管理用試料における添加物質に対する 食品成分の影響に関する検討 別添 1

精度管理調査試料の作製方法の ヒアリング調査

A. 研究目的

食品衛生検査分野の精度管理調査用試料の作製方法については、具体的情報及び報告が極めて少ないのが現状である。そこで平成10年度に引き続き現時点での情報を出来るだけ入手することと、今後の作製方法のあり方等に対する意見を聴取するために、関連専門家によるヒアリング調査を行った。

B. 研究方法

以下の専門家による会議を開催し、各分野についての現状報告と意見を聴取した。

小木勝博（厚生省生活衛生局食品保健課、
GLP 査察官）

小沼博隆（国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部、室長）

佐々木久美子（国立医薬品食品衛生研究所・食品部、室長）

村山三徳（国立医薬品食品衛生研究所・食品部、主任研究官）

田村行弘（東京都立衛生研究所・精度管理室長）

山井志郎（神奈川県衛生研究所・細菌病理部長）

丹野憲二（財団法人・日本食品分析センター・微生物部長）

その他、秋田県衛生科学研究所及び財団法人秋田県予防衛生協会を訪問し、精度管理用調査試料等に関して意見の交換を行った。

C. 結果

1) 理化学的検査用試料

食材に近い、液状、半固体、固体の均質性ならびに安定性の高い調査試料を作製が望まれた。

保存料等の調査試料〈事例の1〉東京都内食品衛生検査施設での精度管理調査では、保存可能な調査試料と用時調製の調査試料を用いた。保存可能な調査試料としては、練りあんの保存料（安息香酸、サリチル酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル）が実際の調査に使用されている。練りあんの着色料（食用黄色4号、食用青色1号）の定性試験も実施されている。用時調製の調査試料では、配付した手順書に従い、粉碎した食品素材に一定量の亜硝酸、亜硫酸などを添加し測定する。評価方法は、添加物の回収率と管理図によって行う。ソルビン酸の管理線は回収率70～105%などの例が示された。

〈事例の2〉（財）食品薬品安全センターでの外部精度管理調査試料の例（表1）では、市販品である味噌中のソルビン酸は添加量の明確性に欠けるが、均質性が確保できる。評価は、各参加施設の平均値の平均値を指示値としてzスコアと管理図（R管理線のみ）によって評価した。一般に化学的検査用試料では、テフロン及びポリエチレン系樹脂に対するパラオキシ安息香酸エステルのように目的物質が試料容器に吸着する場合があるので注意を要することが報告された。重金属検査用試料では、清涼飲料水の他に、精白米をカドミウム水溶液に浸漬すると比較的均質なカドミウム含有米の調査試料が調製可能なことが紹介された。残留農薬検査用試料には実際の食材の試料が望ましいが、野菜等の試料の調製は難しく、食用油に農薬を溶解した試料を用いる方法が現状では止む得ないとの意見があった。また、内部精度管理あるいは小規模の外部精度管理調査において用時調製試料の採用も可能であるとの報告もあった。

精度管理用試料では各試料中の目的物質の均一性の確保が必要である。平成11年度に実施された食品衛生外部精度管理調査の残留動物用医薬品検査用試料では試料ビンに鶏肉とフルベンダゾールを共存させたものが用いられたが、本物質は肉汁による代謝が少なく、比較的安定な医薬品であり、適正な調査試料と考えられるとの意見が出された。

2) 細菌学的検査用試料

細菌数測定のための試料で、安定性を確保するのはなかなか難しいが、食材に近い調査試料が望ましいとの意見が多かった。特に細菌を添加し攪拌する試料作製法では種々検討を要することがあるとの意見があった。

〈事例の3〉東京都内食品衛生検査施設での精度管理調査では、菌液試料及びそば粉試料における生菌数測定の $x-R$ 管理及び z -スコアの例が報告された。特に生菌数測定のためのそば粉試料は有用であった。また、そば粉を内部精度管理調査試料として利用している(財)日本食品分析センターの結果が報告された。8か月保存しても標準偏差が小さく内部精度管理調査試料として有用であると報告された。菌数測定における表現は、現行の実数ではなく対数表示が望ましいこと、細菌数測定方法の基本的検討が必要であり、培地の選択が極めて重要との意見があった。

〈事例の4〉細菌同定用試料について(財)食品薬品安全センターで調査された結果が報告された。細菌同定試料としてマッシュポテト中での接種菌の安定性の検討結果では、グリセリン添加による試料の保水性の確保と、高濃度の菌接種(10^4 cf/g以上)で、目的の菌種(大腸菌及びサルモネラ菌)への実用が可能であることが示唆された。

D. 考察

精度管理調査用試料の作製法として、理化学的調査試料および細菌学的検査用試料も食

材に近い調査試料の作製が望まれた。一方、目的物質(細菌も含む)の含有分布の均質性が高く、かつ試料中で長期間安定性が確保できる調査試料が望まれる。外部精度管理調査の場合は作製後の安定性と輸送中の安定性も確認されねばならない。本年度は、食材に近い調査試料についてより実際的かつ具体的な適正試料の作製法について検討した。

理化学的検査用試料においては、初めて添加量に明確性に欠ける市販味噌中のソルビン酸の外部精度管理に採用した例や、用事調製の調査試料について意見の交換を行った。前者は、統計処理上の問題、管理線の設定について、後者は、大規模な外部精度管理調査に使用できるかなど課題があった。また、重金属検査試料では、カドミウム水溶液に浸漬処理した精白米が有望であるなど、今後も種々の調査項目についてより適正な食材試料の作製方法の検討が必要とされた。

細菌数測定では、そば粉やカカオ外殻粉末などの天然微生物汚染の食材粉体が有用であること、菌数は対数表示が適切であること、細菌数測定法の問題には培地の選定が重要であることが指摘されたが、これらは今後の課題である。

E. 結論

精度管理調査用試料の作製法として、各専門家の報告と今後の調査試料について意見を聴取した。調査試料は、対象物質の均質性及び安定性が高く食材に近い調査試料の作製方法の検討が必要とされた。理化学的検査用試料では、市販味噌のように添加量に明確性を欠く試料や用事調製試料の可能性について検討した。また、細菌数測定試料では、そば粉やカカオ外殻粉末などの天然微生物汚染の食材粉体が有用であること、細菌同定では、マッシュポテトを培地とする大腸菌やサルモネラ菌の試料が実用可能とされた。

表1. 平成11年度食品衛生外部精度管理調査用試料

対象機関	調査項目	対象物質	試料形態
参加施設：514 検疫所 地方衛生研究所 保健所 食肉衛生検査所 食品衛生検査所 市場衛生検査所 指定検査機関	①保存料	ソルビン酸： 0.5396 ±0.03683 g/kg ^{a)}	ソルビン酸を含むみその調製(0.55~0.65g/kg)を業者に委託する。
	②重金属	Cd:0.20μg/g Pb:2.50μg/g	市販乳酸菌飲料-水-硝酸(21:83.316:0.4)を含む溶液に重金属標準液(Cd, Pb)を加える。 送付試料/300ml
	③残留農薬	クロルピリホス： 0.45μg/g プロチオホス： 0.35μg/g	クロルピリホス及びプロチオホスを含む大豆油-ヘキサソ(9:1)混合液の調製を業者に委託する。 送付試料/25g
	⑥残留動物用医薬品	フルベンダゾール 0.10μg/g (鶏肉当たり)	フルベンダゾール1.00μgを含む容器に鶏肉10gを加える。 送付試料/6調査試料
	④菌数測定	生菌数： 1.311570x10 ⁶ ±1.029867x10 ⁶ cfu/g ^{a)}	粉碎し均質にしたカカオ外皮。 送付試料/50g
	⑤・⑦ 細菌同定	送付2試料容器の一方に 大腸菌を含む	液菌マッシュポットに大腸菌または <i>klebsiella pneumoniae</i> (いずれも約10 ⁴ cfu/g)を添加したもの。 ⑤：細菌同定1；⑦：細菌同定2

a)：平成11年度の報告値におけるデータ・クリーニング後の平均値の平均値(̄)

①～⑦：送付回数番号

II-3. 精度管理用試料における添加物質に対する食品成分の影響に関する検討 別添2

理化学的検査調査用試料の作製法の検討

A. 目的

食品衛生外部精度管理調査に使用する理化学的検査の調査用試料の適切な作製法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 市販味噌中のソルビン酸濃度の均質性と安定性

1) 試料

味噌：新庄みそ(株)「白味噌」

特定日付の市販品を購入した。

2) 測定方法

「食品衛生検査指針(理化学編)」に準拠した水蒸気蒸留・高速液体クロマトグラフ法に従って実施した。

試料 50 g を精秤してビーカーに採り、蒸留水 100 mL を加えてかき混ぜ、リトマス試験紙を用いて水酸化ナトリウム溶液(1→10)および硫酸(1→10)で中和して、これを 500 mL の丸底フラスコに移し、酒石酸溶液(15→100) 5 mL および塩化ナトリウム 80 g を加え、シリコーン樹脂 1 滴を添加した後、全量を蒸留水で約 200 mL とした。これを 10 mL/min の留出速度で、留液 500 mL を採取した。この留液を高速液体クロマトグラフに供して、ソルビン酸を測定した。

高速液体クロマトグラフ条件：

高速液体クロマトグラフ	： 島津 LC-10A
検出器	： 島津 SPD-10A
検出波長	： 230 nm
カラム	： YMC-pack ODS-AM (150×)
移動相	： 5 mM ケン酸緩衝液 (pH 4.0)： アセトリル：メタノール 7：2：1
流量	： 1.0 mL/min
カラムオーブン	： 40℃

(2) 清涼飲料水中の重金属(鉛およびカドミウム)濃度の均質性と安定性

1) 試料

清涼飲料水：カルピスウォーター(カルピス株式会社製)

2) 作製方法

カルピスウォーター 21000 mL、蒸留水 83316 mL、硝酸(重金属測定用) 400 mL、カドミウム原液(1000 ppm) 21 mL および鉛原液(1000 ppm) 263 mL をそれぞれ採取して混合し、約30分間攪拌して試料を作製した。

3) 測定方法

検体中のカドミウムおよび鉛を「食品衛生検査指針(理化学編)」に準拠して測定した(資料添付)。測定は検体各5試料について行った。安定性は、作製当日、15日後、40日後について調べた。

(3) カドミウムを添加した精白米中のカドミウム濃度の均質性

1) 試料

精白米：「ひとめぼれ」、福島県産、1999年生産

2) 作製方法

カドミウム溶液(3濃度、0.013 mol/L 硝酸溶液)に精白米を加えて一昼夜浸漬した。この間、数回良く攪拌した。翌日に容器を傾斜して溶液を除去し、精白米をろ紙上に3日間放置して水分を除去した後、約100gずつポリエチレン製容器に入れ、これを5か所の検査機関に送ってカドミウム濃度の測定を依頼した。

作製濃度	0.5 ppm	2 ppm	4 ppm
蒸留水(mL)	29,960	29,915	4 L *2
硝酸 (mL)	25	25	
ガドリウム溶液 (mL) *1	15	60	
精白米 (kg)	20	20	35
作製年月日	2000.2.1	2.1	1999.3.20

*1 : 1000 ppm

*2 : ガドリウム溶液 (4.0 ppm、0.013 mol/L 硝酸溶液)

3) 測定方法

各検査機関に食品衛生法に準拠した検査方法による検査を依頼した(全ての依頼先の測定方法は、食品衛生法に準拠した原子吸光光度法を採用していた)。

委託検査機関:

(社)食品衛生協会 食品衛生研究所

(財)日本食品分析センター

(財)食品環境検査協会

東京顕微鏡院

(財)日本冷凍食品検査協会

以下、順不同でA~E機関とする。

(4) 作製試料(大豆油)中の有機リン系農薬(クロルピリホス、プロチオホス)の均質性と経時的な安定性

1) 試料

大豆油: 試薬(関東化学(株)製)

2) 作製方法

クロルピリホス 45.58 mg を精秤してヘキサンの溶解し、ヘキサンで 100 mL に定容した。また、プロチオホス 35.80 mg を精秤してヘキサンに溶解し、ヘキサンで 100 mL に定容した。各溶液 10 mL を採取してヘキサンで 100 mL とした後、それぞれその 60 mL を採取して、大豆油 5.4 kg を加えた後にヘキサンで全量を 6 kg として検体を作製した。

(作製濃度: クロルピリホス 0.45 $\mu\text{g/g}$ プロチオホス 0.35 $\mu\text{g/g}$)。

3) 測定方法

検体の作製後、速やかに大豆油中の有機リン系農薬濃度の測定を行った。また、経時的に濃度を測定して安定性についても調べた。

試料 1 g を精秤して、残留農薬分析用ヘキササン 10 mL に溶解した後、残留農薬分析用アセトニトリル(ヘキサン飽和) 20 mL ずつで 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を採り減圧下で濃縮後、窒素気流下で溶媒を留去し、残渣をアセトン 10 mL で溶解して、ガスクロマトグラフに供した。

ガスクロマトグラフ: 機種 GC-17A (炎光光度型検出器付)

カラム: DB-5 (内径 0.53 mm, 長さ 30 mm, 膜厚 0.25 μm)

注入口, 検出器温度: 280 $^{\circ}\text{C}$

カラムオープン温度: 60 $^{\circ}\text{C}$ (3 min), 昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 200 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), 昇温 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 250 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)

キャリアーガス: ヘリウム

流量: 11.4 mL/min

(5) 動物用医薬品(フルベンダゾール)のガラス容器への分注およびグリセリンの有無によるフルベンダゾールの量と安定性

1) 作製方法

フルベンダゾール 10.1 mg を精秤してメタノールに溶解してメタノールで 1000 mL に定容した。さらにこの溶液をメタノールで希釈して、最終濃度 0.25 mL に調製した。この溶液 4 mL を広口 6 号ガラス瓶に採取した後、減圧下でメタノールを留去してガラス瓶 1 本当たりフルベンダゾール 1 μg を分注した。

2) 測定方法

上記のフルベンダゾールを分注したガラス瓶に、下記の高速度液体クロマトグラフの移動相 2 mL を加え超音波洗浄器にて 2 分間処理した後、高速度液体クロマトグラフの試験液とした。

高速液体クロマトグラフ条件：

高速液体クロマトグラフ	： 島津 LC-10A
検出器	： 島津 SPD-10A
検出波長	： 290 nm
カラム	： mightysil RP-18 (H) (150×6.0 mm)
移動相	： アセトニトリル：水 7：13
流量	： 1.0 mL/min
カラムオーブン	： 40℃

C. 研究結果

(1) 市販味噌中のソルビン酸濃度の均質性と経時的な安定性

市販の同一日付（同一ロット）の味噌を購入してソルビン酸濃度を食品衛生法に基づく水蒸気蒸留法（添付表には測定法Aと表示）により測定した。その結果、ソルビン酸濃度は 0.524～0.568 mg/kg（平均 0.545 mg/kg ±標準偏差 0.011、変動係数 1.96%）であった。また、10個の包装された試料について、1包装につき2回の繰り返し測定によって味噌中のソルビン酸濃度の均質性を調べた結果は、F値が 1.90 と 5%水準 ($F_{9,10}$) 3.02 より小さかった。一方、ソルビン酸濃度の経時的な安定性の検討では、市販の味噌の購入入手 37 日後の測定値は購入当日の 102.3% であった。

分析法に起因する測定結果への影響を少なくする目的で可能な限り簡易にした分析法を使用してソルビン酸濃度を測定した。今回使用した方法は、味噌から水でソルビン酸を抽出後、メンブランフィルターでろ過して高速液体クロマトグラフに供する操作である。上記の味噌の同一ロットの試料 10 個を 1 包装について 2 回の繰り返し測定を行った結果、ソルビン酸濃度は 0.431～0.586 mg/kg（平均 0.559 mg/kg ±標準偏差 0.019、変動係数

3.40%）であった。食品衛生法に基づく測定法と比較して、迅速かつ簡易に測定することができた。この時の味噌中のソルビン酸濃度の F 値は 1.10 であった。

(2) 清涼飲料水中の重金属（鉛およびカドミウム）濃度の均質性と経時的な安定性

市販の清涼飲料水にカドミウムおよび鉛を添加して、その濃度の均質性と経時的な安定性を調べた。その結果、作製した検体の濃度は、鉛では作製予定濃度 2.5 $\mu\text{g/g}$ に対して 2.52 $\mu\text{g/g}$ （標準偏差 0.01、変動係数 0.40%）、カドミウムでは作製予定濃度 0.20 $\mu\text{g/g}$ に対して 0.208 $\mu\text{g/g}$ （標準偏差 0.01、変動係数 0.48%）であった。各濃度の経時的な安定性は、作製当日と比較して鉛では作製 14 日後で 96.8%、40 日後で 102.0%、カドミウムでは作製 14 日後で 100.0%、40 日後で 98.5% であった。

(3) カドミウムを添加した精白米中のカドミウム濃度の均質性

硝酸酸性にしたカドミウム溶液（3 濃度）に精白米を浸漬して、カドミウム添加の精白米を作製した。4.0 ppm 溶液からの作製は、1999 年 3 月 3 日に実施した。この作製当時のカドミウム濃度は、3 検査機関で測定した結果、3.53～3.95 ppm（標準偏差 0.07、変動係数 1.27～1.90%）であった。約 1 年間冷蔵庫中（5℃）で保管した検体のカドミウム濃度は、2.95～3.81 ppm（2000 年 3 月 10 日前後測定）であった。なお、1 年後の測定を実施した 5 検査機関の中で、1 施設が 3 ppm 以下の結果を出したが、他の 4 検査機関では 3.30～3.81 ppm と 1 年前の測定結果 3.58～3.95 ppm と近似した結果であった。一方、2 ppm 溶液からの作製では、1.77～2.29 ppm と若干幅のある結果であった。0.5 ppm 溶液からの作製で

は、0.50~0.59 ppmと 2 ppm溶液から作製した検体より濃度幅が小さかった。

(4) 作製試料（大豆油）中の農薬濃度の均質性と経時的な安定性

大豆油に有機リン系農薬（クロルピリホスおよびプロチオホス）を添加して、その時の有機リン系農薬濃度の均質性と経時的な安定性について調べた。作製予定濃度はクロルピリホス 0.45 $\mu\text{g/g}$ 、プロチオホス 0.35 $\mu\text{g/g}$ とした。10個の検体について繰り返し 2回ずつ測定した結果、前者が 0.43 $\mu\text{g/g}$ （標準偏差 0.014、変動係数 3.13%）、後者が 0.332 $\mu\text{g/g}$ （標準偏差 0.012、変動係数 3.67%）であった。F 値は、クロルピリホス 1.47、プロチオホス 0.37 と 5% 水準 ($F_{9,10}$ 3.02) より小さかった。濃度の経時的な安定性は、作製 7 日後のそれぞれの濃度を 100% とし検体作製 14 日後と 28 日後について調べた。その結果、安定性はクロルピリホス 98.0%、103.3%、プロチオホス 101.9%、105.6%、と作製 28 日後まで使用可能と考えられた。

(5) 動物用医薬品（フルベンダゾール）のガラス容器への分注による影響と安定性

ガラス容器へメタノールに溶解したフルベンダゾールを分注した時の溶液中のフルベンダゾール量と経時的な安定性を調べた結果、作製予定濃度 1.00 $\mu\text{g/容器}$ に対して、1.01 $\mu\text{g/容器}$ （標準偏差 0.036、変動係数 3.31%）であった。検体入手日の濃度を 100% とすると入手 23 日後は 98.9%、入手 44 日後は 101.1% であった。一方、グリセリン（ガラス容器に分注後 1000 mg/容器相当）を含むメタノールに溶解したフルベンダゾールをガラス容器に分注した場合は、検体入手当日、5 試料のうち 2 試料が 0.001 $\mu\text{g/容器}$ 以下、3 試料が 0.034~0.308 $\mu\text{g/容器}$ であった。入手 23 日

後には 0.162 $\mu\text{g/容器}$ （標準偏差 0.039、変動係数 23.98%、 $n=5$ ）、入手 44 日後は 0.251 $\mu\text{g/容器}$ （標準偏差 0.056、変動係数 22.47%）と、作製予定量 1.00 $\mu\text{g/容器}$ より少ない量であった。

D. 考察

市販の味噌、清涼飲料水、米、油を対象として、理化学的検査用試料作製を試み、添加した諸化学物質の試料中での均質性や安定性を検討した。その結果、

(1) 市販味噌試料中のソルビン酸濃度の均質性は、同一ロットの 10 試料間のソルビン酸濃度の F 値は 1.98 と 5% 水準より小さく、当試料のソルビン酸濃度は均質であることが判明し、市販食品の食品添加物濃度の均質性を調べることで、市販食品を食品形態の精度管理調査試料として使用することも可能と考えられた。また、ソルビン酸濃度の安定性について検討した結果、味噌の購入・入手の 37 日後でも入手当日の 102.3% の安定性が認められ、この期間は、精度管理調査用検体として使用可能であることも判った。今後、食品形態の精度管理調査用試料を得るために、種々の市販食品中の食品添加物の均質性および安定性を調査する予定とする。

(2) 簡易なソルビン酸濃度の分析法の検討を行い、味噌中のソルビン酸を高速液体クロマトグラフの移動相で振盪抽出して測定する方法を試み、食品衛生法に従って水蒸気蒸留法で測定した結果と比較した。その結果両法によって近似した結果を得ることができ、また F 値による均質性の評価も良好であった。

外部精度管理調査で使用する分析方法は、食品衛生法に示された方法とすることが原則であろう。しかし、作製検体の均質性および安定性を検討する場合には、迅速で再現性の高い結果を得ることができれば、食品衛生法に従った分析方法に限らないであろう。

(3) 市販の清涼飲料水に重金属（鉛およびカドミウム）を添加して、その濃度の均質性と経時的な安定性を調べた結果、何れの重金属もほぼ予定濃度の試料を作製することができた。また、濃度の安定性も作製40日後で十分に保たれていた。今回検討した鉛およびカドミウムの試料作製方法および保管方法は、調査用検体の作製方法として、採用できることが判った。

(4) カドミウム濃度を変えて溶液中に米を浸漬する方法で作製した含有量の異なるカドミウム汚染精白米は、いずれの濃度でも、ほぼ予定の濃度の試料を作製することができた。特に 0.5 ppm溶液から作製した精白米の濃度は、2.0 ppm および 4.0 ppm溶液から作製した精白米の濃度よりばらつきが少なかった。

また、4.0 ppm 溶液から調製しておいたカドミウム米中のカドミウム濃度は、1 機関を除いて、作製当時の測定と変動の小さい結果であった。しかし、作製濃度の違いによる濃度のばらつきは、作製濃度の違いなのか、それとも繰り返し作製のばらつきに起因しているのか、今回の検討結果からは明確ではなかった。今後 さらに検討回数を増やして作製方法の再現性について検討することが検討課題である。また、カドミウムが溶液から精白米へ効率よく移行することは、興味深い。

以上のことから、当作製方法は、精度管理調査検体の作製法として採用できる可能性があると考えられる。

(5) 液状の食品試料として大豆油を選び、有機リン系農薬（クロルピリホス、プロチオホス）を添加して、濃度の均質性と安定性について調べた結果、濃度の均質性が確保されること、作製28日後の検査でこの期間は安定であることが判明した。液状食品の残留農薬検査調査用試料の作製方法として採用できると考えられた。

(6) 動物用医薬品（フルベンダゾール）をガラス容器に分注して溶媒留去するときのフル

ベンダゾール量の均質性と経時的な安定性を調べた結果、溶媒留去時のキーパーとしてグリセリンを添加した場合は、添加しない場合と比較してガラス容器中フルベンダゾール量の変動が大きく、また、経時的な安定性も悪く、フルベンダゾールのキーパーとしてグリセリンは、不適であることが判った。グリセリンを添加しない場合には、容器間の変動は小さく、均質性は良好であった。また、経時的な安定性も良好であり、当作製方法は、精度管理調査試料の作製方法として採用可能と考えられた。

E. 結論

理化学的検査用試料の作製法としては、

- (1) 市販の味噌は、食品形態のソルビン酸検査調査用検体として採用できる。
- (2) 精度管理調査用試料の均質性および安定性の評価に使用する分析方法として、簡便迅速な分析方法が採用できる。
- (3) 精度管理調査試料の液状検体の作製法として硝酸酸性にした清涼飲料水がカドミウムおよび鉛の媒体として採用できる。
- (4) 固形の精度管理調査試料の作製方法として、硝酸酸性カドミウム溶液に精白米を浸漬する方法が均質なカドミウム濃度の精白米を得るために有用であり、作製1年後においても均質な濃度が保たれる。
- (5) 残留農薬検査の液状試料の作製方法として、有機溶媒に溶解した有機リン系農薬溶液を大豆油に混合することで、均質な濃度の調査検体の作製が可能である。その濃度は作製後28日間安定であった。
- (6) 動物用医薬品（フルベンダゾール）のガラス容器への分注およびグリセリンの有無による均質性と経時的な安定性を調査し、溶媒を留去する時のキーパーとしてグリセリンは不適であることが判った。

資料

1. 試料の灰化法（硝酸法）

カドミウム, 鉛

試料 50 g (ケルダール分解フラスコ)

硝酸 10 ~ 40 mL

加熱

内容物が暗色になりはじめたら硝酸を追加
(2 ~ 3 mL ずつ程度)

加熱

内容物が無色になった後, 加熱乾固する. 残渣に 0.1M 硝酸
20 mL を加え加温して, メスフラスコ (50 mL) に移す.
ケルダール分解フラスコに新たに 0.1M 硝酸 20 mL を加え
加温した後, 先のメスフラスコに加える. また新たに, 0.1M
硝酸 5 mL を加え加温して 先のメスフラスコに加え, 0.1M
硝酸で 50 mL に定容する.

試験溶液

2. 原子吸光光度計の条件

使用ガス

可燃性ガス; アセチレン

支燃性ガス; 空気

ランプ

中空陰極ランプ

波長

カドミウム; 228.8 nm

鉛; 283.8 nm

表 1. 市販味噌のソルビン酸濃度

単位 : mg/kg

検体番号	測定法 A		測定法 B	
	結果 I	結果 II	結果 I	結果 II
1	0.548	0.548	0.562	0.461
2	0.560	0.568	0.527	0.443
3	0.539	0.550	0.542	0.431
4	0.540	0.551	0.561	0.441
5	0.545	0.552	0.581	0.456
6	0.526	0.537	0.571	0.475
7	0.546	0.538	0.586	0.456
8	0.524	0.553	0.585	0.493
9	0.536	0.536	0.552	0.470
10	0.555	0.541	0.545	0.475
平均値	0.545		0.559	
標準偏差	0.011		0.019	
変動係数(%)	1.96		3.40	

表 2. 市販味噌のソルビン酸濃度の経時的安定性

単位 : mg/kg

検体番号	入手22日後	入手37日後
1	0.572	0.566
2	0.529	0.541
3	0.528	0.577
4	0.531	0.542
5	0.524	0.597
平均値	0.536	0.564
標準偏差	0.020	0.023
変動係数(%)	3.69	4.21
安定性(%) *	95.9	100.9

冷蔵庫保管

安定性(%) * : 上記測定法 B の平均値を 100%

表 3. 作製清涼飲料水中の重金属（鉛）濃度と経時的安定性

単位： $\mu\text{g/g}$

検体番号	作製当日	作製14日後	作製40日後
1	2.53	2.47	2.56
2	2.52	2.40	2.59
3	2.51	2.41	2.53
4	2.51	2.45	2.56
5	2.53	2.45	2.59
平均値	2.52	2.44	2.57
標準偏差	0.01	0.03	0.03
変動係数(%)	0.40	1.23	1.17
安定性(%)	100.0	96.8	102.0

作製濃度： $2.5 \mu\text{g/g}$, 冷蔵庫保管

表 4. 作製清涼飲料水中の重金属（カドミウム）濃度と経時的安定性

単位： $\mu\text{g/g}$

検体番号	作製当日	作製14日後	作製40日後
1	0.208	0.209	0.205
2	0.209	0.208	0.204
3	0.209	0.208	0.205
4	0.207	0.208	0.205
5	0.200	0.209	0.205
平均値	0.208	0.208	0.205
標準偏差	0.001	0.001	0.008
変動係数(%)	0.48	0.48	2.91
安定性(%)	100.0	100.0	98.5

作製濃度： $0.20 \mu\text{g/g}$, 冷蔵庫保管