

の技術的問題なのか、採用した検査方法の問題なのか、様々な要因が考えられる。調査試料の不備による問題であるならば、公定法を採用して陰性とした施設が、同じ検体を別法（BGLB 培地の採用）で検査して検査結果を陽性とする事は無いはずである。また、検査施設の技術的問題については、現時点において我々自身が検証するのは困難である。そこで、公定法として採用されている方法について基礎的検討を試みた。

今回の基礎的検討結果では、まず公定法として採用されている「EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養によるガス産生の判定」により種々の菌株を用いて検討した結果、大腸菌の汚染濃度、大腸菌の性状によっては、本試験方法で大腸菌が存在していても陰性となりうる事が示唆された。これは、培地の特性、培養温度などによる結果と考えるが、EC 培地の大腸菌に対する選択性を試験方法に採用する場合には、検査試料を直接 EC 培地で培養するのではなく、一度増菌培養（例えば、乳糖ブイヨン、SCD 培地、BGLB 培地などで  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 24~48 時間前培養を行う）を実施した後、EC 培地（ $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養）で培養する手順などを採用した方がより正確に大腸菌を検出する事ができるものとする。

今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、「調査試料としての基材の開発」と「採用が予想される検査方法の検証」の両面から詳細な検討が必要ではないかと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1. BGLB 培地での培養に伴う沈殿の生成とガス産生

試験菌株	前培養 沈殿の有無	培 養 時 間			
		24 時間培養後		48 時間培養後	
		沈殿の有無	ガス産生	沈殿の有無	ガス産生
IFO 3240	+	+	30%	+	70%
NIHJ	-	-	-	+	<5%
DH-1	+	-	10%	+	25%
IFO 3139	-	-	20%	+	40%
NHL u5/41	+	-	10%	-	10%
NCTC9001	-	-	30%	+	70%
HIC1207	-	-	-	-	-
HIC 1203	-	-	30%	-	50%
HIC 2211	+	+	20%	+	50%
ATCC 8739	+	+	10%	+	40%

表 2. BGLB 培地での培養に伴う添加菌数と生菌数測定

試験菌株	初発菌数	培 養 時 間	
		24 時間後	48 時間後
		IFO 3240	$2.0 \times 10^1$
NIHJ	$7.0 \times 10^1$	$1.9 \times 10^7$	$2.0 \times 10^5$
DH-1	$1.0 \times 10^1$	$5.9 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$
IFO 3139	$7.0 \times 10^1$	$1.6 \times 10^8$	$7.1 \times 10^7$
NHL u5/41	$3.0 \times 10^1$	$8.2 \times 10^5$	$2.0 \times 10^7$
NCTC9001	$5.0 \times 10^1$	$1.6 \times 10^8$	$3.9 \times 10^7$
HIC1207	$5.0 \times 10^1$	$7.2 \times 10^7$	$7.7 \times 10^3$
HIC 1203	$9.0 \times 10^1$	$6.0 \times 10^7$	$4.6 \times 10^6$
HIC 2211	$4.0 \times 10^1$	$1.2 \times 10^8$	$3.4 \times 10^7$
ATCC 8739	$7.0 \times 10^1$	$8.9 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$

表 3. EC 培地での培養に伴う沈殿の生成とガス産生

試験菌株	前培養 沈殿の有無	培 養 時 間			
		24 時間培養後		48 時間培養後	
		沈殿の有無	ガス産生	沈殿の有無	ガス産生
IFO 3240	+	+	20%	+	50%
NIHJ	-	-	-	-	-
DH-1	+	+	-	+	-
IFO 3139	-	-	-	-	-
NHL u5/41	+	+	5%	+	10%
NCTC9001	-	+	20%	+	25%
HIC1207	-	-	-	-	-
HIC 1203	-	-	15%	+	50%
HIC 2211	+	+	5%	+	50%
ATCC 8739	+	+	-	+	40%

表 4. EC 培地での培養に伴う添加菌数と生菌数測定

試験菌株	初発菌数	培 養 時 間	
		24 時間後	48 時間後
		IFO 3240	$2.0 \times 10^1$
NIHJ	$7.0 \times 10^1$	$3.4 \times 10^5$	$3.7 \times 10^6$
DH-1	$1.0 \times 10^1$	$2.4 \times 10^7$	$7.9 \times 10^6$
IFO 3139	$7.0 \times 10^1$	< 10	< 10
NHL u5/41	$3.0 \times 10^1$	$3.0 \times 10^7$	$9.6 \times 10^1$
NCTC9001	$5.0 \times 10^1$	$1.4 \times 10^7$	$6.3 \times 10^6$
HIC1207	$5.0 \times 10^1$	< 10	< 10
HIC 1203	$9.0 \times 10^1$	$2.9 \times 10^7$	$7.4 \times 10^6$
HIC 2211	$4.0 \times 10^1$	$201 \times 10^7$	$6.2 \times 10^6$
ATCC 8739	$7.0 \times 10^1$	$2.7 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$

表 5. BGLB 培地中での *E. coli* HIC2211 の経時的生菌数変化とガス産生

菌数レベル	初発菌数	測定	培養時間					
			接種直後	3 時間後	6 時間後	24 時間後	30 時間後	48 時間後
10 <sup>1</sup>	1.8×10 <sup>1</sup>	生菌数	< 10	2.1×10 <sup>2</sup>	2.1×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	7.5×10 <sup>7</sup>	6.2×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	30%	40%	80%
10 <sup>2</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	生菌数	2.0×10 <sup>1</sup>	3.4×10 <sup>2</sup>	9.5×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	7.1×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	10%	15%	50%
10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>3</sup>	生菌数	1.1×10 <sup>2</sup>	3.6×10 <sup>3</sup>	9.9×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	8.3×10 <sup>7</sup>	7.0×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	30%	40%	60%

註：マッシュポテト共存下

表 6. BGLB 培地中での *E. coli* HIC2211 の経時的生菌数変化とガス産生

菌数レベル	初発菌数	測定	培養時間					
			接種直後	3 時間後	6 時間後	24 時間後	30 時間後	48 時間後
10 <sup>1</sup>	1.8×10 <sup>1</sup>	生菌数	< 10	3.0×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>3</sup>	8.4×10 <sup>7</sup>	1.1×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	15%	20%	50%
10 <sup>2</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	生菌数	1.0×10 <sup>1</sup>	2.9×10 <sup>2</sup>	6.9×10 <sup>4</sup>	7.4×10 <sup>7</sup>	9.0×10 <sup>7</sup>	4.0×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	20%	50%	70%
10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>3</sup>	生菌数	2.3×10 <sup>2</sup>	1.5×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	7.7×10 <sup>7</sup>	8.3×10 <sup>7</sup>	3.5×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	25%	25%	60%

註：マッシュポテト非共存下

表 7. EC 培地中での *E. coli* HIC2211 の経時的生菌数変化とガス産生

菌数レベル	初発菌数	測定	培養時間					
			接種直後	3 時間後	6 時間後	24 時間後	30 時間後	48 時間後
10 <sup>1</sup>	1.8×10 <sup>1</sup>	生菌数	<10	<10	1.6×10 <sup>3</sup>	6.2×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	3.1×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	15%	25%	60%
10 <sup>2</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	生菌数	1.0×10 <sup>1</sup>	1.1×10 <sup>2</sup>	5.0×10 <sup>4</sup>	8.0×10 <sup>7</sup>	5.4×10 <sup>7</sup>	4.3×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	20%	30%	60%
10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>3</sup>	生菌数	2.0×10 <sup>2</sup>	8.7×10 <sup>2</sup>	7.6×10 <sup>4</sup>	5.1×10 <sup>7</sup>	6.0×10 <sup>7</sup>	5.7×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	20%	30%	60%

註：マッシュポテト共存下

表 8. EC 培地中での *E. coli* HIC2211 の経時的生菌数変化とガス産生

菌数レベル	初発菌数	測定/ 判定	培養時間					
			接種直後	3 時間後	6 時間後	24 時間後	30 時間後	48 時間後
10 <sup>1</sup>	1.8×10 <sup>1</sup>	生菌数	<10	1.0×10 <sup>1</sup>	1.7×10 <sup>3</sup>	5.8×10 <sup>7</sup>	5.0×10 <sup>7</sup>	4.9×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	15%	15%	60%
10 <sup>2</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	生菌数	4.0×10 <sup>1</sup>	9.0×10 <sup>1</sup>	5.8×10 <sup>3</sup>	3.8×10 <sup>7</sup>	7.5×10 <sup>7</sup>	7.2×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	10%	15%	60%
10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>3</sup>	生菌数	3.0×10 <sup>2</sup>	6.4×10 <sup>2</sup>	6.9×10 <sup>4</sup>	5.7×10 <sup>7</sup>	4.0×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>7</sup>
		ガス産生	—	—	—	15%	15%	50%

註：マッシュポテト非共存下

表 9. EC 培地中での *E. coli* HIC2211 及び *E. coli* ATCC8739 のガス産生

試験菌株	接種菌数 レベル	測定/ 判定	培養時間	
			24 時間後	48 時間後
<i>E. coli</i> HIC2211	10 <sup>0</sup>	濁度	1	4
		ガス産生	—	50%
	10 <sup>1</sup>	濁度	1	4
		ガス産生	—	30%
	10 <sup>2</sup>	濁度	2	4
		ガス産生	—	50%
	10 <sup>3</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	50%	60%
	10 <sup>4</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	10%	60%
<i>E. coli</i> ATCC8739	10 <sup>0</sup>	濁度	<0.5	<0.5
		ガス産生	—	—
	10 <sup>1</sup>	濁度	<0.5	<0.5
		ガス産生	—	—
	10 <sup>2</sup>	濁度	2	4
		ガス産生	—	50%
	10 <sup>3</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	—	50%
	10 <sup>4</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	—	50%

註：マッシュポテト存在下

表 10. EC 培地中での *E. coli* HIC2211 及び *E. coli* ATCC8739 のガス産生

試験菌株	接種菌数 レベル	測定/ 判定	培養時間	
			24 時間後	48 時間後
<i>E. coli</i> HIC2211	10 <sup>0</sup>	濁度	<0.5	3
		ガス産生	—	20%
	10 <sup>1</sup>	濁度	2	4
		ガス産生	—	70%
	10 <sup>2</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	—	70%
	10 <sup>3</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	5%	70%
	10 <sup>4</sup>	濁度	4	4
		ガス産生	10%	70%
<i>E. coli</i> ATCC8739	10 <sup>0</sup>	濁度	0.5	0.5
		ガス産生	—	—
	10 <sup>1</sup>	濁度	1	3
		ガス産生	—	50%
	10 <sup>2</sup>	濁度	2	4
		ガス産生	<5%	50%
	10 <sup>3</sup>	濁度	3	4
		ガス産生	10%	60%
	10 <sup>4</sup>	濁度	4	4
		ガス産生	15%	60%

註：マッシュポテト非存在下

表 11. 大腸菌の発育及びガス産生に対する培養温度の影響

試 験 菌 株	発育及びガス産生			
	44.5℃、24 時間培養		32.5℃、24 時間培養 <sup>1)</sup>	
	発育・増殖	ガス産生	発育・増殖	ガス産生
<i>E. coli</i> IFO3240 <sup>2)</sup>	陽 性	陽 性	— <sup>5)</sup>	—
<i>E. coli</i> HIC2211 <sup>3)</sup>	陰 性	陰 性	陽 性	陽 性
<i>E. coli</i> ATCCC8739 <sup>4)</sup>	陰 性	陰 性	陰 性 <sup>6)</sup>	陰 性

1) 44.5℃で24時間培養後、32.5℃で24時間培養した結果

2) ガス高度産生能を有する菌株

3) ガス中度産生能を有する菌株

4) ガス弱産生能を有する菌株

5) —：実施せず

6) 32.5℃、24時間培養後に生菌確認をした結果、生菌を認めない。

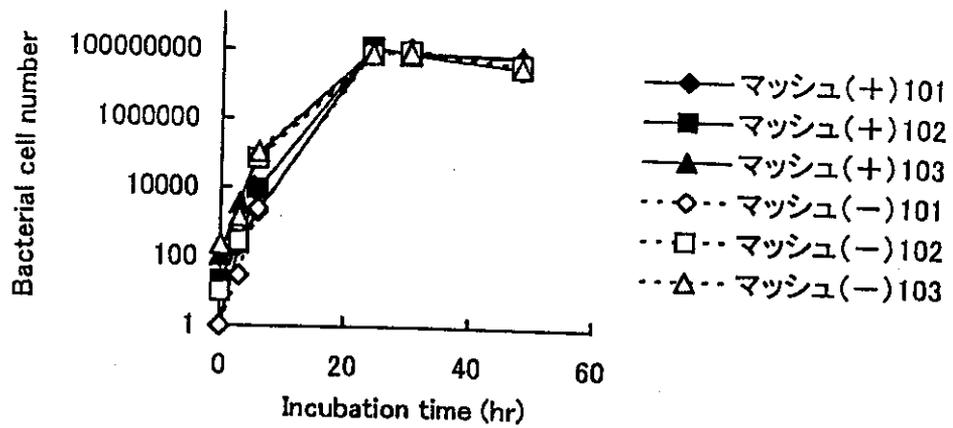


図 1. Growth curve of *E. coli* HIC2211 in BGLB broth

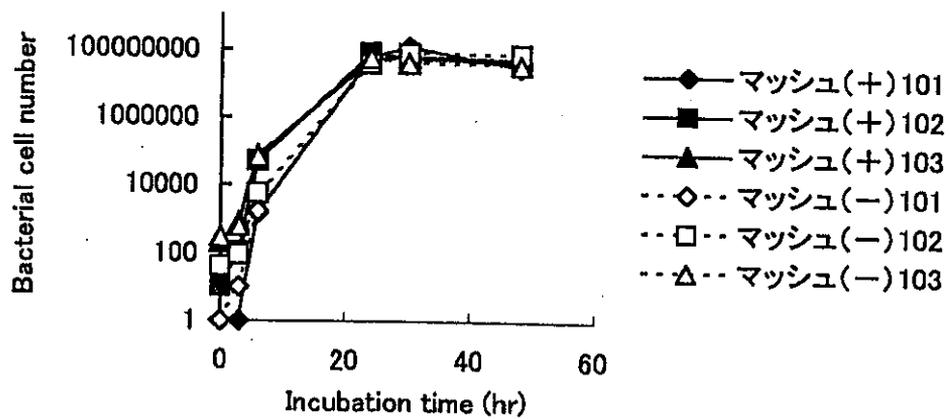


図 2. Growth curve of *E. coli* HIC2211 in EC broth

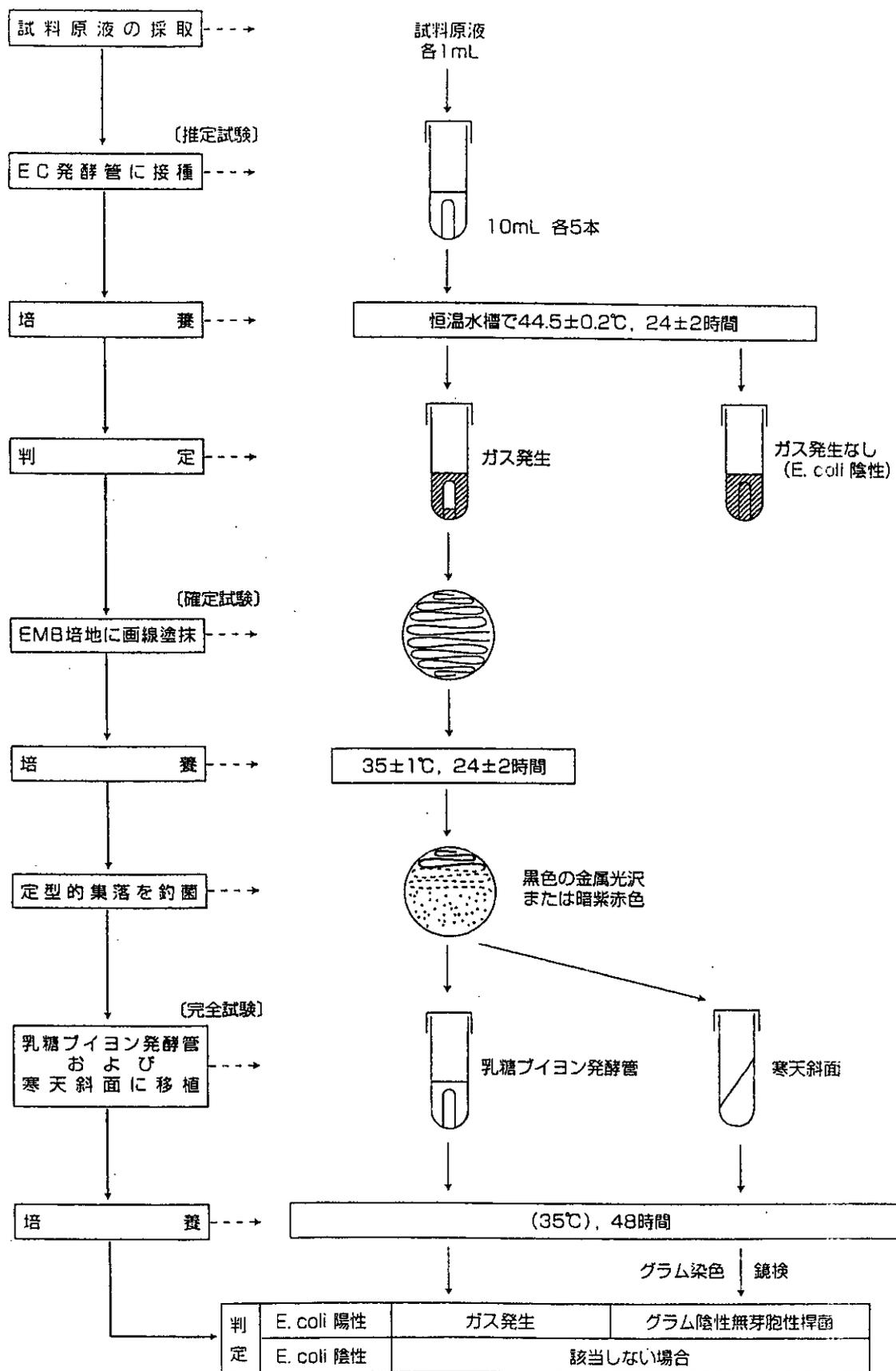


図3. 加熱食肉製品（加熱殺菌後包装）および乾燥食肉製品の大腸菌検査手順

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および  
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査  
における適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その4）  
—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

主任研究者 柳澤 健一郎 （財）食品薬品安全センター 理事長  
分担研究者 松木 容彦 （財）食品薬品安全センター-秦野研究所 副所長  
協力研究者 福原 克治 （財）食品薬品安全センター-秦野研究所 室長  
大隅 昇 文部科学省統計数理研究所 教授

**研究要旨**

安全で安心な食品を供給するためには、食品中の残留物、汚染物および食品添加物等の各種の化学物質を検査することが必須である。そのためには、検査法の確からしさを確認する手段として、精度管理調査を実施することになる。その精度管理調査に使用する検査試料は、検査対象物質の濃度が均一で、検査期間において濃度が安定であることが求められる。このような目的で、検査試料において濃度が均一で安定な試料の開発を検討、研究した報告は極めて少なく、適切な検査試料の開発が遅れている。

今年度は、カドミウム、残留農薬（有機リン系農薬）および残留動物用医薬品の検査試料について検討、研究した。カドミウムの検査試料として玄米、白米および粉碎した白米について、また、カドミウム汚染米とカドミウムを添加して作製した添加玄米について、とうせい（精米）によるぬか部位へのカドミウム分布の違いについても検討した。残留農薬の検査試料については、にんじんを採用して、水蒸気処理（ブランチング）したペースト状に試料について検討した。残留動物用医薬品の検査試料としては、液状の食品として液卵を使用しフルベンダレールを添加して濃度の均一性および安定性について検討した。

その結果、いずれの検討事項についても適切な結果が得られ、重金属（カドミウム）、残留農薬（有機リン系農薬）および残留動物用医薬品の検査に使用できる調査試料を開発することができた。

**A. 研究目的**

食品衛生検査に係わる検査機関の外部精度管理調査に使用する「調査試料」の作製方法を確立することを目的として、以下の検討を実施した。

**B. 研究方法**

1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製方法の検討

重金属（カドミウム）検査に使用する食材調査試料として、玄米、無洗米および白米の適用性について検討した。また、作製したカドミウム添加米試料とカドミウム汚染米のぬか部分と白米部分へのカドミウム

の濃度分布について調べた。

#### 1) 1. に用いた食材および試薬

玄米：ひとめぼれ，宮城県産，生産年 2001 年，白米：ひとめぼれ，宮城県産，生産年 2001 年，無洗米：ひとめぼれ，宮城県産，生産年 2001 年，カドミウム汚染玄米：国産，生産年 2002 年，硝酸：有害金属測定用，関東化学株式会社，カドミウム標準液（1000 ppm）：原子吸光分析用，関東化学株式会社，水：注射用水，光製薬株式会社

#### 2) 試料作製法

##### ①カドミウム添加玄米（添加玄米）およびカドミウム添加無洗米（添加無洗米）

硝酸酸性溶液にカドミウム標準液（1000 ppm）を添加した後，水で 2 L に定容し，カドミウム濃度 2 ppm の溶液を調製した。これに玄米あるいは無洗米約 1.5 kg を添加した後，24 時間放置した。この間 5 回，良く攪拌した。ザルで玄米あるいは無洗米を採り，ろ紙上に 3 日間放置して，水分を蒸散させ添加玄米と添加無洗米を得た。また，それぞれ添加玄米と添加無洗米のカドミウム濃度を測定した。

##### ②カドミウム添加白米（添加白米）

硝酸酸性溶液にカドミウム標準液（1000 ppm）を加えた後，水で 20 L に定容し，濃度 2 ppm のカドミウム溶液を調製した。この溶液に白米 15 kg を添加した後，24 時間静置した。この間 5 回，良く攪拌した。ザルで白米を採り，ろ紙上に 3 日間放置して，水分を蒸散後，白米のカドミウム濃度を測定した。

##### ③粉碎白米

②で作製したカドミウム添加白米に適量のカドミウム無添加白米を加え，遠心粉碎機で粉に粉碎して目標濃度（約 0.47 ppm）の粉碎白米を作製した。

#### ④カドミウム添加玄米と汚染玄米の精米操作（精米：ぬかと白米に分離）

家庭用のとうせい機（精米機）を使用して，添加玄米と汚染玄米をとうせい（精米）して，とうせい前の玄米およびとうせい後の白米のカドミウム濃度をそれぞれ測定した。

#### 3) 測定

##### ①濃度測定分析機関

2) で作製して得られた試料を，当研究所および外部の検査機関に委託してカドミウム濃度を測定した。

##### 委託検査機関

（財）日本食品分析センター，（財）食品環境検査協会および，日本穀物検定協会  
以後は，順不同で各検査機関を A～C 機関とした。

##### ②測定法

測定法は，当研究所および外部の検査機関のいずれにおいても食品衛生法に準拠した原子吸光光度法を採用した。

試料中のカドミウムの測定は，食品衛生法に準拠して測定した。すなわち，試料 10g をケルダール分解フラスコに量り，硝酸 40 mL を添加して，加熱，分解した。硝酸による激しい反応が終了後，硫酸 20 mL を加え，溶液が暗色になったら硝酸を 2～3 mL 追加して溶液が透明になるまで加熱を繰り返した。分解液を水で希釈しながらメスフラスコに移し，100 mL に定容した。この試料液 50 mL を採り，DDTC-MIBK 法により抽出を行い，原子吸光光度法により以下の条件でカドミウムを測定した。

原子吸光光度計の条件

原子吸光光度計 AA-660 株式会社 島津製作所

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

## 2. 残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料の作製法の検討

とうもろこし油を基材とし、残留農薬（有機リン系農薬：クロルピリホス、マラチオン）検査に使用する調査試料の作製を行った。

### 1) 用いた食材および試薬

とうもろこし油：日華油脂(株)，株式会社，クロルピリホスおよびマラチオン：(残留農薬分析用)（関東化学株式会社），ヘキサンおよびアセトニトリル：(残留農薬分析用)（和光純薬工業株式会社）

### 2) 試料作製法

とうもろこし油 900 g に，クロルピリホス（12 mg/L）およびマラチオン（120 mg/L）のヘキサン溶液を，それぞれ 10 mL ずつ加えて，ヘキサンで全量を 1000 g に調整した後，容器（25 g 容量）に小分けして冷蔵庫（5 ± 2 °C）に保管した。作製目的濃度は，クロルピリホス 0.12 μg/g，マラチオン 1.2 μg/L とした。

### 3) 測定方法

試料 1.0 g を精秤して，残留農薬分析用ヘキサン 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 ずつで抽出操作を 3 回繰り返した。アセトニトリル層を合わせ，減圧下（40 °C 以下）で濃縮後，窒素気流下で溶媒を留去し，残渣をヘキサン 10 mL で溶解してガスクロマトグラフの試験溶液とした。

#### ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A（炎光光度型検出器付）

カラム：DB-210（内径 0.25 mm，長さ 30 mm，膜厚 0.25 μm）

注入口温度：260 °C，検出器温度：260 °C

カラムオープン温度：60 °C（2 min），昇温 20 °C/min，240 °C（15 min）

キャリアーガス：ヘリウム，流量：0.8 mL/min 線速度：19 cm/sec

水素：60 kpa 空気：70 kpa

試料導入：スプリットレス

## 3. 残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料の作製法の検討

にんじんを基材とし，残留農薬（有機リン系農薬）検査に使用する調査試料の作製を行った。

### 1) 用いた食材および試薬

にんじん（マイクロベースト状食材）：株式会社 新進，EPN，クロルピリホス，ダイアジノン，フェニトロチオンおよびマラチオン（残留農薬分析用）：関東化学株式会社，ヘキサンおよびアセトニトリル（残留農薬分析用）：和光純薬工業株式会社

### 2) 試料作製法

にんじんの冷凍品を一昼夜，冷蔵庫中で解凍して，その 5 kg を速やかにテフロンコーティングステンレス容器（20 L 容）に採り，これに有機リン系農薬（EPN，クロルピリホス，ダイアジノン，フェニトロチオン，マラチオン）のアセトン溶液を添加した。ステンレス製大型スパテル 3 本で 5 分間ずつ 3 回，攪拌した後，低温実験室（0 ~ 5 °C）に保管した。24 時間後に，再度，ステンレス製大型スパテルで 5 分間，攪拌した後，約 200 g ずつポリプロピレン製容器に小分けにした。なお，以上の作製操作は，n = 3 で実施し，それぞれステンレス容器 3 容器から作製した試料容器（ポリプロピレン製容器）を無作為に 3 個ずつ採取して，合計 9 個の容器について，有機リ

ン系農薬を測定した。

### 3)測定方法

試料 20 g を秤量して分液ロートに採り、アセトン 100 mL を加えて5分間振とう・抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて5分間振とう・抽出を行い先のろ液と合わせて、約 25 mL まで減圧濃縮した。濃縮液に 10 %塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、20%酢酸エチル含有ヘキサン 100 mL ずつで、2回、振とう・抽出(10分間)した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をアセト 5 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条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A (炎光光度型検出器付)

カラム：DB-210 (内径 0.25 mm, 長さ 30 mm, 膜厚 0.25 μm)

注入口温度：260 °C, 検出器温度：260 °C

カラムオープン温度：60°C (2 min), 昇温 20 °C/min, 240 °C (15 min)

キャリアーガス：ヘリウム, 流量：0.8 mL/min 線速度：19 cm/sec

水素：60 kpa 空気：70 kpa

試料導入：スプリットレス

### 4. 残留動物用医薬品(フルベンダゾール)検査調査試料の作製法の検討

液卵を基材に実施用して、残留動物用医薬品(フルベンダゾール)検査に使用する調査試料の作製を行った。

#### 1)用いた食材および試薬

液卵：市販の鶏液卵, フルベンダゾール：(残留動物用医薬品検査用)(関東化学株式会社), アセトニトリル, 酢酸エチル,

メタノール, 無水硫酸ナトリウム：(試薬特級)(和光純薬工業株式会社), アセトニトリル, メタノール：高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業株式会社)

#### 2)試料の作製法

水約 1 kg にフルベンダゾールを含むメタノール溶液約 200 mL および液卵 4 kg を加え良く攪拌した。全量を水で 8 kg に調整し、良く攪拌した後、ポリエチレン製容器に約 25 g ずつ分注した。フルベンダゾール作製目的濃度は、0.53 μg/g とした。

#### 3)測定方法

測定操作は食品衛生法に準拠した。液卵 2.5 g を採取して酢酸エチル 50 mL ずつで2回抽出し、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解して、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつで2回抽出して、油脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、液体クロマトグラフの移動相 1 mL に溶解して、高速液体クロマトグラフに供した。

#### 高速液体クロマトグラフ条件

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 LC-10A

検出器：島津製作所 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：メタノール 7：13

流量：1.0 mL/min

カラムオープン：40°C

### C. 研究結果

#### 1. 重金属(カドミウム)検査調査試料の作製法の検討

1)カドミウム添加の玄米, 無洗米および白米  
カドミウム添加玄米(添加玄米), カドミ

ウム添加無洗米（添加無洗米）およびカドミウム添加白米（添加白米）については、小分けにした送付容器（25 g）から無作為に3容器を採り、外部の3検査機関に各容器について  $n = 3$ （合計9測定値）でカドミウム含量測定を委託した。その結果、添加玄米では  $1.54 \sim 1.65 \pm 0.023 \sim 0.096 \mu\text{g/g}$ 、無洗米では  $1.72 \sim 1.90 \pm 0.010 \sim 0.036 \mu\text{g/g}$  および白米では  $2.10 \sim 2.18 \pm 0.045 \sim 0.068 \mu\text{g/g}$  と、カドミウム含量の標準偏差は容器間および容器内のいずれにおいても小さかった。また、全測定値（3容器、 $n = 3$ 、即ち  $n = 9$ ）の平均値は、玄米で  $1.58 \pm 0.060 \mu\text{g/g}$ 、無洗米で  $1.80 \pm 0.090 \mu\text{g/g}$ 、および精白米では  $2.20 \pm 0.060 \mu\text{g/g}$ 、であった（表1）。

### 2) 粉砕白米（カドミウム添加粉砕白米）

粉砕白米（予定作製濃度約  $0.47 \mu\text{g/g}$ ）については、小分けにした容器から無作為に容器10個採取し、それぞれの容器について  $n = 2$  で、カドミウム濃度を測定し、濃度の均一性を調べた。その結果、作製目標濃度約  $0.47 \mu\text{g/g}$  に対して、作製した試料の濃度は、 $0.473 \pm 0.009 \mu\text{g/g}$  と、非常に近似の試料を作製することができた。また、この時のF値が、1.14と5%水準（F値3.02）より小さく、精度管理調査に使用する試料として均一な濃度を確保することができた（表2）。

### 3) カドミウム添加玄米と汚染玄米のとうせい（精米：ぬかと白米に分離）前後のカドミウム濃度

カドミウムを添加した玄米（添加玄米）と自然汚染の玄米（汚染玄米）をとうせい（精米）して、カドミウムのぬかと白米部分への分布を、それぞれ  $n = 3$  で調べた。その結果、添加玄米  $1.57 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ 、添加白米  $0.68 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 、汚染玄米  $1.09$

$\pm 0.02 \mu\text{g/g}$  および汚染白米  $1.00 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  であった。とうせいすることにより、添加玄米では  $1.57 \mu\text{g/g} \rightarrow 0.68 \mu\text{g/g}$ （減少率43.3%）、汚染玄米では  $1.09 \mu\text{g/g} \rightarrow 1.00 \mu\text{g/g}$ （減少率91.7%）、であった（表3）。

## 2. 残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料の作製法の検討

とうもろこし油に有機リン系農薬（クロルピリホス、マラチオン）を添加して、各農薬濃度の均一性を調べた。その結果、クロルピリホス濃度は、作製目標濃度  $0.12 \mu\text{g/g}$  に対して  $0.134 \mu\text{g/g}$ （標準偏差0.007、変動係数5.19）、マラチオンの濃度は、作製目標濃度  $1.2 \mu\text{g/g}$  に対して  $1.342 \mu\text{g/g}$ （標準偏差0.065、変動係数4.87）であった。この時のF値は、クロルピリホスが1.13、マラチオンが0.71と5%水準（F値3.02）より小さく、容器間の試料の農薬濃度は、調査試料として適切であった（表4）。また、添加濃度の安定性を調べた結果、作製当日の濃度に比較して作製32日後はクロルピリホスが98.2%（標準偏差5.5）、マラチオンが98.2%（標準偏差2.8）レベルであり32日後においても、調査試料として使用可能と考えられた。

## 3. 残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料の作製方法の検討

試料の作製は、市販のにんじんスープ基材〔収穫後、水蒸気処理（プランチング）してペーストに加工〕に有機リン系農薬（EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン）を添加した。作製した3ロット（3容器）の添加試料について、それぞれ  $n = 3$  で含量を測定

(合計9測定値)した。

その結果、それぞれの測定値±標準偏差  $\mu\text{g/g}$  (予定作製濃度  $\mu\text{g/g}$ ) は、EPN  $0.93 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  ( $1.0 \mu\text{g/g}$ )、クロルピリホス  $0.09 \pm 0.00 \mu\text{g/g}$  ( $0.1 \mu\text{g/g}$ )、ダイアジノン  $0.05 \pm 0.00 \mu\text{g/g}$  ( $0.05 \mu\text{g/g}$ )、フェニトロチオン  $0.10 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$  ( $0.1 \mu\text{g/g}$ ) およびマラチオン  $0.10 \pm 0.00 \mu\text{g/g}$  ( $0.1 \mu\text{g/g}$ ) であった。予定目標濃度に対して 90 ~100%の範囲であった。また、それぞれの農薬濃度の標準偏差は、0.00~0.05%であった(表5)。

#### 4. 残留動物用医薬品(フルベンダゾール)検査調査試料の作製方法の検討

鶏の液卵に、水を加えた後、フルベンダゾールのメタノール溶液を加えて、攪拌・混合し、残留動物用医薬品添加液卵材料を作製した。容器に分注後、容器10個を無作為に採取し、それぞれの容器について  $n = 2$  でフルベンダゾール濃度を調べた。また、凍結保存し、濃度の安定性についても調べた。その結果、予定作製濃度  $0.50 \mu\text{g/g}$  に対して、作製した試料の濃度は、 $0.496 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$  と、予定作製濃度に非常に近い濃度の試料を作製することができた(表6)。また、F値が、1.38と5%水準(F値 3.02)より小さく、容器間の試料の濃度は、調査試料として適切であった。試料濃度の安定性は、作製後42日間、冷凍保存( $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ )した試料において、作製当日濃度の  $102.2 \pm 0.01\%$ の濃度が確保できた。

#### D. 考察

##### 1. 重金属(カドミウム)検査調査試料の作製方法の検討

1)カドミウム添加の玄米、無洗米および

白米

玄米には、カドミウム濃度の規格基準(1ppm)が定められている。そこでカドミウム検査の精度管理調査に使用可能な試料の作製方法を玄米、無洗米および白米を用いて、検討した。その結果、いずれの試料においても、ほぼ予定濃度の試料を作製することができた。また、容器内の試料濃度±標準偏差は  $1.54 \sim 2.18 \pm 0.010 \sim 0.096 \mu\text{g/g}$  と、小さい標準偏差を示した。今後、試料の作製を繰り返し行い作製方法の再現性および精度管理調査の配布容器に小分けした場合の配布容器間の濃度の均一性について検討する予定である。

2)カドミウム添加白米を粉碎した粉碎白米(カドミウム添加粉碎白米)

先に作製したカドミウム添加白米の濃度を測定した後、カドミウム無添加白米を加えて予定作製濃度のカドミウム添加粉碎白米を作製する方法では、ほぼ100%の予定作製濃度の調査試料を作製することができること、および小分けした試料容器間のカドミウム濃度のF値(10個の試料容器から  $n = 2$  で採取して濃度を測定)が1.14(5%水準 F値 3.02)と、濃度の均一性も確保でき、当作製方法が、調査試料の作製方法として、適切であると判断した。

##### 2. 植物油の残留農薬(有機リン系農薬)検査調査試料の作製法の検討

2002年度は、中国野菜の残留農薬が食品衛生の分野で重要な課題であった。その残留農薬検査の基本となる精度管理に使用する調査試料の提供は、緊急を要している。しかし、農薬を農作物に直接添加する方法では、農薬濃度の均一性および安定性等、多くの検討事項が残っている。そこで、当面、継続的に残留農薬の精度管理調査を实

施するために、比較的容易に作製可能と考えられる液状の食材として植物油（とうもろこし油）を使用して、これに有機溶媒に溶解した有機リン系農薬（クロルピリホス、マラチオン）を添加する作製方法を検討し、小分けした容器間の濃度の均一性および安定性等が確保できることが分かった。

### 3. 農作物の残留農薬（有機リン系農薬） 検査調査試料の作製法の検討

農作物に農薬を添加して調査試料を作製する事前の検討として、収穫後に水蒸気処理により酵素分解したんじんのペースト（スープ用食材の市販品）に有機リン系農薬（EPN, クロルピリホス, ダイアジノン, フェントロチオン, マラチオン）を添加して、濃度の均一性を調べた。

その結果、作製した有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、予定作製濃度に対して、90～100%の範囲で、測定濃度の標準偏差（ $n = 3$ ）は、0.00～0.05%であった。調査試料として予定作製濃度の試料を、小さい標準偏差の濃度で、適切に作製できることが分かった。今後、作製後に小分けした容器 10 個を無作為に抽出して、同じ容器から繰り返し 2 回の測定を行い、容器間の試料濃度の検定を実施する予定である。

### 4. 残留動物用医薬品（フルベンダゾール） 検査調査試料の作製法の検討

従来、残留動物用医薬品の精度管理試料には食肉を使用してきた。しかし、食肉に直接残留動物用医薬品を添加することが、濃度の均一性の観点から難しく、精度管理調査結果の評価を困難にしていた。そこで、液状の食材として残留動物用医薬品の規格基準がある液卵を使用して、これに残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添

加する作製方法を検討した。市販の液卵は、クロマトグラムにフルベンダゾールの測定を妨害する成分の出現はなく、また、濃度の均一性も確保できた。

精度管理調査においては、外部調査および内部調査を問わず、いかに適正な調査試料の提供の可否が重要な課題である。適正な調査試料を使用した調査であれば、最適の調査結果の提供を可能とする。しかし、各検査機関の日常検査のスケジュールに合わせて、最適な残留農薬や残留動物用医薬品調査試料を提供することは非常に難しい状況にある。今後も、各検査機関の要望に添った実食材に近い試料の提供に傾注したい。

### E. 結論

1. 玄米、無洗米および白米にカドミウムを添加して、精度管理調査試料を作製できる可能性が分かった。

2. カドミウムを添加して作製した白米にカドミウム無添加白米を加えて、粉碎する方法が、作製濃度の調整、均一性および安定性が確保できる適切な方法であることが分かった。

3. カドミウム添加玄米と汚染玄米のぬかと白米部位へのカドミウムの分布には、違いがあることが分かった。とうせい（精米）することによりカドミウム添加玄米では 56.7%、汚染玄米では 8.3%のカドミウム濃度の減少が確認された。

4. 液状の食材として植物油（とうもろこし油）に有機リン系農薬を添加して作製した試料は、濃度の均一性および安定性において調査試料に使用できることが分かった。

5. 収穫後に水蒸気処理を行ったにんじんのペースト（スープ用食材の市販品）に有

機リン系農薬添加して作製した試料は、濃度の均一性において調査試料に使用できる可能性が分かった。

6. 液卵に残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する方法で、濃度の均一性および安定性において適切な調査試料を作製できることが分かった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 カドミウム添加玄米、無洗米および白米の測定結果

	単位 $\mu\text{g/g}$			
	A 容器	B 容器	C 容器	平均値 $\pm$ 標準偏差
玄 米	1.55 $\pm$ 0.047	1.54 $\pm$ 0.023	1.65 $\pm$ 0.096	1.58 $\pm$ 0.060
無洗米	1.79 $\pm$ 0.010	1.72 $\pm$ 0.010	1.90 $\pm$ 0.036	1.80 $\pm$ 0.090
白 米	2.18 $\pm$ 0.068	2.10 $\pm$ 0.045	2.31 $\pm$ 0.047	2.20 $\pm$ 0.106

表2 白米のカドミウム濃度の均一性の結果

単位 $\mu\text{g/g}$				
試料番号	測定①	測定②		
1	0.465	0.479	平均値	0.473
2	0.478	0.471	標準偏差	0.008
3	0.480	0.460	変動係数	1.69
4	0.481	0.481	F 比	0.64
5	0.495	0.466		
6	0.469	0.469	有意水準 5 %	3.02
7	0.468	0.470		
8	0.471	0.474		
9	0.465	0.465		
10	0.460	0.484		

表3 カドミウム添加玄米と汚染米およびとうせい（精米）の測定結果

	測定①	測定②	測定③	平均値±標準偏差
カドミウム添加玄米	1.55	1.58	1.57	1.57±0.02
カドミウム添加精米	0.67	0.68	0.68	0.68±0.01
カドミウム汚染米	1.09	1.11	1.08	1.07±0.02
カドミウム汚染精米	0.97	1.01	1.03	1.00±0.03

単位μg/g

表4 とうもろこし油の農薬濃度の均一性の結果

クロルピリホス			マラチオン		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.142	0.133	1	1.43	1.30
2	0.145	0.125	2	1.43	1.26
3	0.147	0.136	3	1.45	1.36
4	0.140	0.132	4	1.40	1.36
5	0.137	0.134	5	1.39	1.34
6	0.132	0.133	6	1.29	1.39
7	0.130	0.135	7	1.28	1.39
8	0.138	0.129	8	1.35	1.28
9	0.133	0.126	9	1.33	1.29
10	0.127	0.118	10	1.31	1.20
平均値	0.134		平均値	1.34	
標準偏差	0.007		標準偏差	0.065	
変動係数	5.22		変動係数	4.84	
F比	1.13		F比	0.71	
有意水準5%	3.02		有意水準5%	3.02	